Šis dokuments ir tikai informatīvs, un tam nav juridiska spēka. Eiropas Savienības iestādes neatbild par tā saturu. Attiecīgo tiesību aktu un to preambulu autentiskās versijas ir publicētas Eiropas Savienības "Oficiālajā Vēstnesī" un ir pieejamas datubāzē "Eur-Lex". Šie oficiāli spēkā esošie dokumenti ir tieši pieejami, noklikšķinot uz šajā dokumentā iegultajām saitēm

►B

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 440/2008

(2008. gada 30. maijs)

par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

(OV L 142, 31.5.2008., 1. lpp.)

Grozīta ar:

		Oficiālais Vēstnesis		
		Nr.	Lappuse	Datums
►M1	Komisijas Regula (EK) Nr. 761/2009 (2009. gada 23. jūlijs)	L 220	1	24.8.2009.
►M2	Komisijas Regula (ES) Nr. 1152/2010 (2010. gada 8. decembris)	L 324	13	9.12.2010.
►M3	Komisijas Regula (ES) Nr. 640/2012 (2012. gada 6. jūlijs)	L 193	1	20.7.2012.
►M4	Komisijas Regula (ES) Nr. 260/2014 (2014. gada 24. janvāris)	L 81	1	19.3.2014.
►M5	Komisijas Regula (ES) Nr. 900/2014 (2014. gada 15. jūlijs)	L 247	1	21.8.2014.
►M6	Komisijas Regula (ES) 2016/266 (2015. gada 7. decembris)	L 54	1	1.3.2016.
►M7	Komisijas Regula (ES) 2017/735 (2017. gada 14. februāris)	L 112	1	28.4.2017.
►M8	Komisijas Regula (ES) 2019/1390 (2019. gada 31. jūlijs)	L 247	1	26.9.2019.

▼B

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 440/2008

(2008. gada 30. maijs)

par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

1. pants

Regulas (EK) Nr. 1907/2006 piemērošanai izmantojamās testēšanas metodes tiek noteiktas šīs regulas pielikumā.

2. pants

Lai uzlabotu veidu, kādā veic izmēģinājumus ar mugurkaulniekiem, tos aizstātu vai samazinātu šādu izmēģinājumu apjomu, šajā regulā noteiktās testēšanas metodes Komisija pēc vajadzības pārskata.

3. pants

Visas atsauces uz Direktīvas 67/548/EEK V pielikumu uzskata par atsaucēm uz šo regulu.

4. pants

Šī regula stājas spēkā nākamajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

To piemēro no 2008. gada 1. jūnija.

▼B

PIELIKUMS

▼M6

Piezīme.

Pirms kādu turpmāk norādīto testēšanas metodi izmanto tam, lai testētu daudzkomponentu vielu (*MCS*), nezināma vai mainīga sastāva vielu, kompleksu reakcijas produktu vai bioloģisku materiālu (*UVCB*) vai maisījumu, un gadījumos, kad tās piemērotība *MCS*, *UVCB* vai maisījumu testēšanai nav norādīta attiecīgajā tekstēšanas metodē, ir jāapsver, vai attiecīgā metode ir piemērota paredzētajam normatīvās regulēšanas nolūkam.

Ja šo testēšanas metodi izmanto *MCS*, *UVCB* vai maisījuma testēšanai, atbilstoši iespējām ir jāsniedz pietiekami daudz informācijas par tā sastāvu, piemēram, tā sastāvdaļu ķīmiskie nosaukumi, to kvantitatīvais saturs un maisījumā iekļauto vielu attiecīgās īpašības.

▼B

A DAĻA: FIZIKĀLI ĶĪMISKO ĪPAŠĪBU NOTEIKŠANAS METODES

SATURS

A.1. KUŠANAS/SASALŠANAS TEMPERATŪRA

A.2. VIRŠANAS TEMPERATŪRA

A.3. RELATĪVAIS BLĪVUMS

A.4. TVAIKA SPIEDIENS

A.5. VIRSMAS SPRAIGUMS

A.6. ŠĶĪDĪBA ŪDENĪ

A.8. SADALĪŠANĀS KOEFICIENTS

A.9. UZLIESMOŠANAS TEMPERATŪRA

A.10. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (CIETAS VIELAS)

A.11. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (GĀZĒM)

A.12. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (KONTAKTĀ AR ŪDENI)

A.13. CIETVIELU UN ŠĶIDRUMU PIROFORĀS ĪPAŠĪBAS

A.14. SPRĀDZIENBĪSTAMĪBA

A.15. PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRA (ŠĶIDRUMI UN GĀZES)

A.16. RELATĪVĀS PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRAS NOTEIKŠANA CIETVIELĀM

A.17. OKSIDĒJOŠĀS ĪPAŠĪBAS (CIETVIELAS)

A.18. POLIMĒRU VIDĒJĀ MOLEKULAS MASA UN MOLEKULAS MASU SADALĪJUMS

A.19. MAZU MOLEKULU MASU SATURS POLIMĒROS

A.20. POLIMĒRU ŠĶĪŠANA/EKSTRAKCIJA ŪDENĪ

A.21. OKSIDIZĒJOŠAS ĪPAŠĪBAS (ŠĶIDRUMI)

A.22. GARUMU SVĒRTAIS ĢEOMETRISKAIS VIDĒJAIS ŠĶIEDRU DIAMETRS

A.23. SADALĪJUMA KOEFICIENTS (1-OKTANOLS/ŪDENS): LĒNĀS MAISĪŠANAS METODE

A.24. SADALĪJUMA KOEFICIENTS (N-OKTANOLS/ŪDENS), AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMHROMATOGRĀFIJAS *(HPLC)* METODE

A.25. DISOCIĀCIJAS KONSTANTES ŪDENĪ (TITRĒŠANAS METODE — SPEKTROFOTOMETRISKĀ METODE — KONDUKTOMETRISKĀ METODE)

▼B

A.1. **KUŠANAS/SASALŠANAS TEMPERATŪRA**

1. **METODE**

Aprakstīto metožu lielākās daļas pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti izmantotās literatūras avotos (2) un (3).

1.1. IEVADS

Šeit aprakstītās metodes un ierīces izmantojamas vielu kušanas temperatūras noteikšanai neatkarīgi no to tīrības pakāpes.

Izvēloties noteikšanas metodi, jāņem vērā attiecīgās vielas īpašības. Rezultātā ierobežojošais faktors ir tas, vai viela ir viegli saberžama pulvera veidā, saberžama ar grūtībām vai arī tā pulvera veidā nav saberžama.

Dažām vielām labāk noteikt sasalšanas vai sacietēšanas temperatūru, tāpēc šajā metodē iekļauti noteikumi par to noteikšanas kārtību.

Ja vielas īpašību dēļ nav ērti nosakāms neviens no iepriekšminētajiem rādītājiem, to vietā var noteikt sastingšanas temperatūru.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Kušanas temperatūra ir tāda temperatūra, kurā pie atmosfēras spiediena notiek fāžu pāreja no cieta agregātstāvokļa šķidrā, un šī temperatūra pilnīgi sakrīt ar sasalšanas temperatūru.

Tā kā daudzām vielām fāžu pāreja notiek zināmā temperatūras intervālā, to parasti norāda kušanas temperatūras intervāla veidā.

Mērvienību pārvēršana (K uz ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatūra pēc Celsija skalas, Celsija grādi (^{o}C)

T: termodinamiskā temperatūra, kelvini (K)

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Dažas kalibrēšanas vielas ir uzskaitītas izmantotās literatūras sarakstā (4).

▼B

1.4. METODES PRINCIPS

Nosaka fāžu pārejas temperatūru (temperatūras intervālu) pārejai no cieta agregātstāvokļa šķidrā. Praktiski nosaka parauga kušanas/sasalšanas sākumu un beigas, paraugu sildot/dzesējot. Aprakstītas piecas dažādas metodes, konkrēti – kapilāra metode, metodes, kurās izmanto sildvirsmas, sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes, termiskās analīzes metodes un sastingšanas temperatūras noteikšana (naftas eļļām).

Dažkārt kušanas temperatūras vietā var būt ērtāk noteikt sasalšanas temperatūru.

1.4.1. **Kapilāra metode**

1.4.1.1. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu*

Nelielu sīki sasmalcinātas vielas daudzumu ievieto kapilārā un sablīvē. Kapilāru kopā ar termometru silda un sildīšanas ātrumu noregulē tā, lai kušanas laikā temperatūra paaugstinātos ne vairāk par 1 K/min. Nosaka temperatūru kušanas sākumā un beigās.

1.4.1.2. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku*

Tāpat kā aprakstīts 1.4.1.1. punktā, izņemot to, ka kapilārs un termometrs ievietoti apsildāmā metāla blokā, un tos var novērot pa blokā izveidotām atverēm.

1.4.1.3. *Fotometriska noteikšana*

Paraugu, kas atrodas kapilārā, automātiski karsē metāla cilindrā. Caur cilindrā izurbtu caurumu gaismas kūli novirza uz vielu un tālāk uz precīzi kalibrētu fotoelementu. Kušanas laikā vielas lielākoties kļūst optiski caurspīdīgas. Uz fotoelementu krītošās gaismas intensitāte palielinās, un tas dod signālu ciparu indikatoram nolasīt sildīšanas kamerā ievietota platīna pretestības termometra rādījumu. Šī metode neder spilgti krāsainām vielām.

1.4.2. **Sildvirsmas**

1.4.2.1. *Koflera sildvirsma*

Koflera sildvirsma sastāv no diviem metāla stieņiem ar atšķirīgu siltuma vadītspēju, kurus karsē ar elektrības palīdzību, turklāt pats stienis ir izgatavots tā, lai temperatūras gradients visā tā garumā būtu gandrīz lineārs. Sildvirsmas temperatūru var mainīt no 283 līdz 573 K, un tā aprīkota ar īpašu temperatūras nolasīšanas ierīci, kam ir kustīga bultiņa un skala, kura pielāgota tieši šai sildvirsmai. Kušanas temperatūras noteikšanai vielu plānā slānī uzklāj tieši sildvirsmai. Pēc dažām sekundēm starp šķidro un cieto fāzi parādās skaidri redzama dalījuma līnija. Temperatūru pie dalījuma līnijas nolasa, novietojot bultiņu tieši pie līnijas.

▼B

1.4.2.2. *Kausējamais mikroskops*

Kušanas temperatūras noteikšanai, kurai vajadzīgs ļoti mazs vielas daudzums, izmanto vairāku veidu mikroskopus ar apsildāmu galdiņu. Parasti sildāmā galdiņa temperatūras mērīšanai izmanto jutīgu termopāri, tomēr dažkārt izmanto arī dzīvsudraba termometrus. Parasti kušanas temperatūras noteikšanas aparātam ar mikroskopu un sildāmu galdiņu ir sildīšanas kamera, kurā ir metāla plate, uz kuras novieto priekšmetstikliņu ar paraugu. Metāla plates vidū ir atvere, caur kuru krīt gaisma no mikroskopa apgaismošanas spoguļa. Noteikšanas laikā kameru noslēdz ar stikla plāksnīti, lai izspiestu gaisu no parauga zonas.

Parauga sildīšanas ātrumu regulē ar reostatu. Augstas precizitātes instrumentos, veicot mērījumus optiski anizotropām vielām, var izmantot polarizētu gaismu.

1.4.2.3. *Meniska metode*

Šo metodi izmanto poliamīdiem.

Vizuāli nosaka temperatūru, kurā pārvietojas silikoneļļas menisks, kas atrodas starp sildvirsmu un segstiklu, ar kuru pārklāts poliamīda paraugs.

1.4.3. **Sasalšanas temperatūras noteikšanas metode**

Paraugu ievieto speciālā mēģenē, ko ievieto sasalšanas temperatūras noteikšanas aparātā. Dzesēšanas laikā paraugu pastāvīgi uzmanīgi maisa un ar piemērotiem intervāliem nolasa temperatūru. Tiklīdz temperatūra vairāku nolasījumu laikā nemainās, šo temperatūru (kurai veic termometra kļūdas korekciju) reģistrē kā sasalšanas temperatūru.

Jāizvairās paraugu pārdzesēt, pastāvīgi uzturot līdzsvaru starp cieto un šķidro fāzi.

1.4.4. **Termiskā analīze**

1.4.4.1. *Diferenciālā termiskā analīze (DTA)*

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas temperatūras starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (kušana) vai eksoterma (sasalšana) nobīde no reģistrētās temperatūras bāzes līnijas.

▼B

1.4.4.2. *Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija (DSK)*

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas patērētās enerģijas starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Šī ir enerģija, kas vajadzīga, lai iestātos temperatūras nulles starpība starp nosakāmo vielu un standartvielu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (kušana) vai eksoterma (sasalšana) nobīde no reģistrētās siltumenerģija plūsmas bāzes līnijas.

1.4.5. **Sastingšanas temperatūra**

Šī metode izstrādāta naftas eļļu analīzēm un ir piemērota eļļveida vielām ar zemu kušanas temperatūru.

Paraugu vispirms sasilda un pēc tam ar noteiktu ātrumu atdzesē, ik pēc 3 K pārbaudot plūstamību. Par sastingšanas temperatūru uzskata un reģistrē zemāko temperatūru, kurā novērojama vielas kustība.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Dati par kušanas temperatūras/kušanas temperatūras intervāla noteikšanas metožu lietojamību un precizitāti apkopoti turpmāk tabulā:

TABULA: METOŽU LIETOJAMĪBA

A. **Kapilāra metodes**

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte [1]	Standartmetode
Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu	jā	tikai daļa	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku	jā	tikai daļa	293 līdz > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotometriska noteikšana	jā	der dažādām vielām, izmantojot papildierīces	253–573 K	± 0,5 K	

[1] Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības.

▼B

B. **Sildvirsmas metodes un sasalšanas temperatūras noteikšana**

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Koflera sildvirsma	jā	nē	283 līdz > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Kausējamais mikroskops	jā	tikai daļa	273 līdz > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniska metode	nē	der tikai poliamīdiem	293 līdz > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes	jā	jā	223 līdz 573 K	± 0,5 K	e.g. BS 4695

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības.

C. **Termiskā analīze**

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Diferenciālā termiskā analīze	jā	jā	173 līdz 1 273 K	līdz 600 K ± 0,5 K līdz 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija	jā	jā	173 līdz 1 273 K	līdz 600 K ± 0,5 K līdz 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības.

D. **Sastingšanas temperatūra**

Mērīšanas metode	Vielas, kuras var saberzt pulverī	Vielas, kuras nevar viegli saberzt pulverī	Temperatūras diapazons	Novērtētā precizitāte (1)	Standartmetode
Sastingšanas temperatūra	naftas eļļām un eļļveida vielām	naftas eļļām un eļļveida vielām	223 līdz 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Atkarībā no instrumenta tipa un vielas tīrības.

1.6. METOŽU APRAKSTI

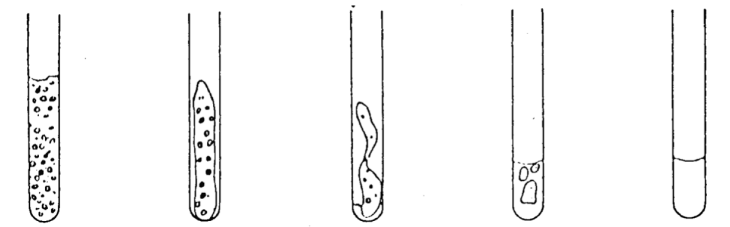
Gandrīz visu šeit minēto metožu apraksts ir iekļauts starptautiskos un atsevišķu valstu standartos (skatīt 1. papildinājumu).

1.6.1. **Kapilāra metodes**

Lēni paaugstinot temperatūru, smalka pulvera veidā sasmalcinātām vielām parasti novērojamas 1. attēlā parādītās kušanas stadijas.

▼B

1. attēls



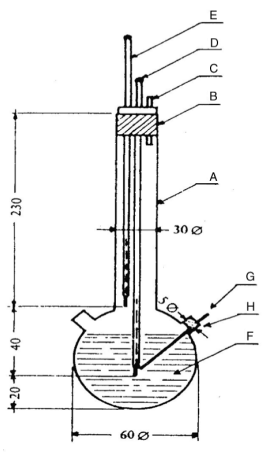
A stadija	(Kušanas sākums) sīki pilieni vienmērīgi izvietojas uz kapilāra iekšējās sienas
B stadija	kušanas sarukuma dēļ starp paraugu un kapilāra sieniņu izveidojas sprauga
C stadija	sarukušais paraugs sāk slīdēt uz leju un pārvēršas šķidrumā
D stadija	uz virsmas izveidojas menisks, tomēr ievērojams parauga daudzums nav izkusis
E stadija	(Kušanas beigas) nav cietu neizkusušu daļiņu

Nosakot kušanas temperatūru, reģistrē kušanas sākumā un beigās novēroto temperatūru.

1.6.1.1. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu*

Standartizēts kušanas temperatūras noteikšanas aparāts parādīts 2. attēlā (JIS K 0064); visi izmēri norādīti milimetros.

2. attēls



A: Mērījumu trauks
B: Aizbāznis
C: Ventilācijas atvere
D: Termometrs
E: Papildu termometrs
F: Vannas šķidrums
G: Stikla kapilārs, 80 līdz 100 mm garš, 1,0 ± 0,2 mm iekšējais diametrs, 0,2 līdz 0,3 mm sieniņu biezums
H: Sānu caurule

▼B

Vannas šķidrums

Izvēlas piemērotu šķidrumu. Šķidrumu izvēlas atkarībā no nosakāmās kušanas temperatūras, piemēram, vazelīneļļu kušanas temperatūrām līdz 473 K, silikoneļļu temperatūrām līdz 573 K.

Kušanas temperatūru noteikšanai, kuras ir lielākas par 523 K, var izmantot maisījumu, kas sastāv no trijām masas daļām sērskābes un divām daļām kālija sulfāta. Izmantojot šāda veida maisījumus, jāievēro visi vajadzīgie piesardzības pasākumi.

Termometrs

Jāizmanto tikai tādi termometri, kuri atbilst šādos vai tiem ekvivalentos standartos noteiktajām prasībām:

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

Procedūra

Sausu vielu smalki saberž piestā un ievieto kapilārā, kuram viens gals ir aizkausēts, pēc sablīvēšanas tai jāaizņem aptuveni 3 mm no kapilāra garuma. Lai iegūtu vienveidīgu parauga blīvumu, kapilāru iemet apmēram 700 mm garā stikla caurulē, kas stāvus novietota uz pulksteņstikla.

Piepildīto kapilāru ievieto vannā tā, lai termometra dzīvsudraba rezervuāra vidusdaļa pieskartos kapilāram vietā, kurā atrodas paraugs. Parasti kapilāru aparātā ievieto tad, kad vannas šķidruma temperatūra ir par apmēram 10 K zemāka par nosakāmo kušanas temperatūru.

Šķidruma temperatūru vannā paaugstina ar ātrumu apmēram 3 K/min. Šķidrums vannā jāmaisa. Kad temperatūra ir aptuveni 10 K zem kušanas temperatūras, tā nedrīkst pieaugt ātrāk par 1 K/min.

Aprēķins

Kušanas temperatūru aprēķina šādi:

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

kur:

T = koriģētā kušanas temperatūra (K),

T_D = D termometra temperatūras rādījums (K),

T_E = E termometra temperatūras rādījums (K),

n = to D termometra dzīvsudraba stabiņa iedaļu skaits, kuras atrodas virs šķidruma.

1.6.1.2. *Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku*

Aprīkojums

Iekārtā ietilpst:

— cilindrisks metāla bloks ar dobu augšdaļu, kas veido kameru (skatīt 3. attēlu),

— metāla aizbāznis ar divām vai vairākām atverēm, caur kurām metāla blokā ievieto kapilārus,

▼B

— metāla bloka sildīšanas sistēma, piemēram, blokā ievietota elektriskā pretestība,

— reostats elektriskās jaudas regulēšanai, ja izmanto elektrisko sildīšanu,

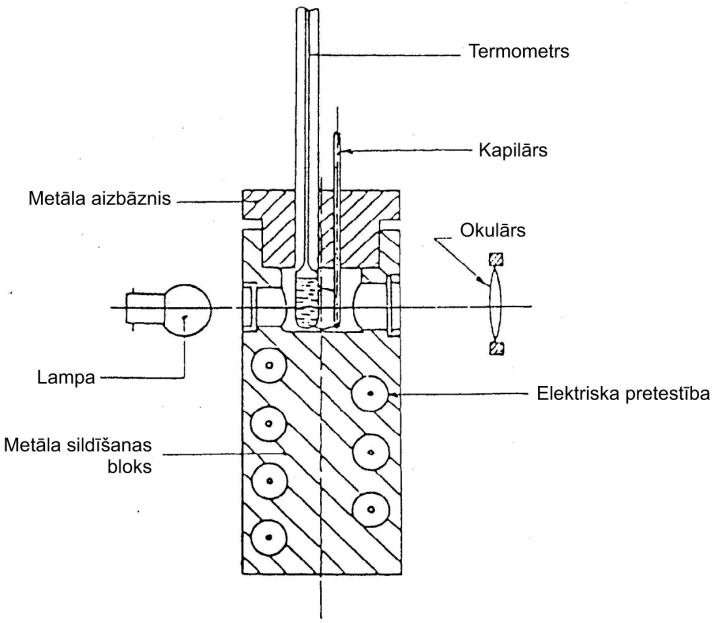
— četri termiski izturīga stikla logi kameras pretējās sānu sienās taisnā leņķī vienam pret otru. Pie viena no šiem logiem ir okulārs kapilāra novērošanai. Pārējos trīs logus izmanto iekšējās telpas apgaismošanai ar lampām,

— vienā galā noslēgts kapilārs no karstumizturīga stikla (skatīt 1.6.1.1. punktu).

Termometrs

Skatīt 1.6.1.1. punktā minētos standartus. Var izmantot arī termoelektriskās mērierīces ar līdzīgu precizitāti.

3. attēls



1.6.1.3. *Fotometriska noteikšana*

Aprīkojums un procedūra

Iekārta sastāv no metāla kameras ar automātisku apsildes sistēmu. Trīs kapilārus aizpilda, kā tas norādīts 1.6.1.1. punktā, un ievieto kamerā.

▼B

Aparatūras kalibrēšanai iespējams izmantot lineāru temperatūras paaugstināšanos ar vairākiem ātrumiem, un vajadzīgo temperatūras lineāro paaugstināšanos elektriski regulē ar iepriekš izraudzītu ātrumu. Reģistrācijas ierīces rāda faktisko krāsns temperatūru un kapilāros esošo vielu temperatūru.

1.6.2. **Sildvirsmas**

1.6.2.1. *Koflera sildvirsma*

Skatīt papildinājumu.

1.6.2.2. *Kausējamais mikroskops*

Skatīt papildinājumu.

1.6.2.3. *Meniska metode (poliamīdiem)*

Skatīt papildinājumu.

Sildīšanas ātrumam kušanas temperatūras diapazonā ap kušanas temperatūru jābūt mazākam par 1 K/min.

1.6.3. **Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes**

Skatīt papildinājumu.

1.6.4. **Termiskā analīze**

1.6.4.1. *Diferenciālā termiskā analīze*

Skatīt papildinājumu.

1.6.4.2. *Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija*

Skatīt papildinājumu.

1.6.5. **Sastingšanas temperatūras noteikšana**

Skatīt papildinājumu.

2. **IEGŪTIE DATI**

Atsevišķos gadījumos ir jāveic termometra kalibrēšana.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta,

— precizitātes novērtējums.

Par kušanas temperatūru uzdod divu tādu mērījumu rezultātu vidējo vērtību, kuri ir novērtētās precizitātes (skatīt tabulā) robežās.

▼B

Ja temperatūras starpība kušanas sākumā un beigās ir metodes precizitātes robežās, par kušanas temperatūru uzdod temperatūru, kas noteikta kušanas beigu stadijā; pārējos gadījumos uzdod abas temperatūras, kas noteiktas kušanas sākuma un beigu stadijās.

Ja vielas sadalās vai sublimējas, nesasniedzot kušanas temperatūru, uzdod temperatūru, kurā novēro minētās parādības.

Jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas saistītas ar rezultātu interpretāciju, jo īpaši attiecībā uz vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 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, p. 505–515.

▼B

Papildinājums

Sīkāki tehniski dati atrodami šādos standartos:

1. **Kapilāra metodes**

1.1. Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu

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 Kapilarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar metāla bloku

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of “melting point”

2. **Sildvirsmas**

2.1. Koflera sildvirsma

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

2.2. Kausējamais mikroskops

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelz-temperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniska metode (poliamīdiem)

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. Détermination du “point de fusion” méthode du menisque

3. **Sasalšanas temperatūras noteikšanas metodes**

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 petrole: determination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de congelation
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termiskā analīze**

4.1. Diferenciālā termiskā analīze

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

▼B

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

4.2. Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija

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

5. **Sastingšanas temperatūras noteikšana**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement 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. VIRŠANAS TEMPERATŪRA

1. METODE

Aprakstīto metožu lielākās daļas pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti izmantotās literatūras avotos (2) un (3).

1.1. IEVADS

Šeit aprakstītās metodes un iekārtas var izmantot šķidrām vielām un vielām ar zemu kušanas temperatūru, ja ar tām par viršanas temperatūru zemākā temperatūrā nenotiek ķīmiskas reakcijas (piemēram: autooksidēšanās, pārgrupēšanās, sadalīšanās u. c.). Šīs metodes piemērotas gan attīrītiem, gan neattīrītiem šķidrumiem.

Priekšroka dodama metodēm, kurās izmanto fotoelektrisko detektēšanu un termisko analīzi, jo pēc šīm metodēm var noteikt gan kušanas temperatūru, gan viršanas temperatūru. Turklāt mērījumus var veikt automātiskā režīmā.

Dinamiskajai metodei ir priekšrocības, kas saistās ar iespēju to izmantot arī tvaika spiediena noteikšanai, un nav jāveic viršanas temperatūras korekcija pēc atmosfēras spiediena normālos apstākļos (101,325 kPa), jo normālo atmosfēras spiedienu var noregulēt mērīšanas laikā ar manostatu.

Piezīmes

Piemaisījumu ietekme uz viršanas temperatūras noteikšanas rezultātu galvenokārt ir atkarīga no piemaisījumu rakstura. Ja paraugā ir gaistoši piemaisījumi, kuri var ietekmēt viršanas temperatūras noteikšanas rezultātus, vielu pirms tam var attīrīt.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Parasti viršanas temperatūru definē kā temperatūru, kurā šķidruma tvaika spiediens ir 101,325 kPa.

Ja viršanas temperatūru nenosaka normālā atmosfēras spiedienā, temperatūras izmaiņu aprakstīšanai atkarībā no spiediena var izmantot Klauziusa-Klapeirona vienādojumu:

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

kur:

P = vielas tvaika spiediens, paskālos,

ΔH_v = vielas iztvaikošanas siltums, J mol^{-1},

R = universālā molārā gāzu konstante = 8,314 J mol^{-1} K^{-1},

T = termodinamiskā temperatūra, K.

Viršanas temperatūru uzdod kopā ar atmosfēras spiedienu tās noteikšanas laikā.

▼B

Pārvēršana

Spiediens (mērvienības: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(“bar” var joprojām izmantot, lai gan tas nebūtu ieteicams).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(mērvienības “mm Hg” un “Torr” izmantot nav pieļaujams).

1 atm = standarta atmosfēra = 101 325 Pa

(mērvienību “atm” izmantot nav pieļaujams).

Temperatūra (mērvienības: K)

t = T – 273,15

t: temperatūra pēc Celsija skalas, Celsija grādi (^{o}C)

T: termodinamiskā temperatūra, kelvini (K)

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Dažas kalibrēšanas vielas ir minētas papildinājumā iekļauto metožu aprakstā.

1.4. METODES PRINCIPS

Piecas viršanas temperatūras (viršanas temperatūras intervāla) noteikšanas metodes pamatojas uz viršanas temperatūras mērīšanu, bet divām citām izmanto termisko analīzi.

1.4.1. **Noteikšana ar ebulioskopu**

Ebulioskopus sākotnēji izveidoja molekulmasas noteikšanai pēc temperatūras paaugstināšanās, taču tie ir piemēroti arī precīzas viršanas temperatūras noteikšanai. Ļoti vienkārša iekārta ir aprakstīta standartā ASTM D 1120-72 (skatīt papildinājumu). Šajā iekārtā līdzsvara apstākļos šķidrumu silda līdz viršanai atmosfēras spiedienā.

1.4.2. **Dinamiskā metode**

Pēc šīs metodes vārīšanās laikā ar piemērotu termometru mēra tvaika kondensācijas temperatūru attecē. Pēc šīs metodes var mainīt spiedienu.

1.4.3. **Viršanas temperatūras noteikšana ar destilācijas metodi**

Ar šo metodi veic tvaika kondensācijas temperatūras mērījumus šķidruma destilācijas laikā un nosaka destilāta daudzumu.

▼B

1.4.4. **Sivolobova metode**

Paraugu silda mēģenē, kas iegremdēta šķidrumā sildīšanas vannā. Tajā pašā mēģenē ar paraugu iegremdē aizkausētu kapilāru ar gaisa burbuli apakšējā galā.

1.4.5. **Fotometriska noteikšana**

Saskaņā ar Sivolobova principu automātiski veic fotoelektriskus mērījumus gaisa burbuļu celšanās brīdī.

1.4.6. **Diferenciālā termiskā analīze**

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas temperatūras starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (viršana) nobīde no reģistrētās temperatūras bāzes līnijas.

1.4.7. **Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija**

Pēc šīs metodes reģistrē nosakāmās vielas un standartvielas patērētās enerģijas starpību atkarībā no temperatūras, uz vielu un standartvielu iedarbojoties ar vienu un to pašu regulējamas temperatūras programmu. Šī ir enerģija, kas vajadzīga, lai iestātos temperatūras nulles starpība starp nosakāmo vielu un standartvielu. Kad paraugam notiek fāžu pāreja ar entalpijas izmaiņām, par tām liecina endoterma (viršana) nobīde no reģistrētās siltumenerģijas plūsmas bāzes līnijas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Dati par viršanas temperatūras/viršanas temperatūras intervāla noteikšanas metožu lietojamību un precizitāti apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

Metožu salīdzinājums

Mērīšanas metode	Novērtētā precizitāte	Standarti
Ebulioskopija	± 1,4 K (līdz 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (līdz 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dinamiskā metode	± 0,5 K (līdz 600 K) (2)	
Destilācijas metode (viršanas diapazons)	± 0,5 K (līdz 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Sivolobova metode	± 2 K (līdz 600 K) (2)	
Fotometriska noteikšana	± 0,3 K (līdz 373 K) (2)	
Diferenciālā termiskā analīze	± 0,5 K (līdz 600 K) ± 2,0 K (līdz 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija	± 0,5 K (līdz 600 K) ± 2,0 K (līdz 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Šāda precizitāte ir tikai noteikšanai ar vienkāršu ierīci, kura aprakstīta, piemēram, standartā ASTM D 1120-72; to var uzlabot, izmantojot pilnīgākas ebulioskopijas iekārtas.

(2) Tikai tīru vielu viršanas temperatūras noteikšanai. Citos gadījumos šīs metodes izmantošana ir jāpamato.

▼B

1.6. METOŽU APRAKSTI

Dažu šeit minēto metožu apraksts ir iekļauts starptautiskos un atsevišķu valstu standartos (skatīt papildinājumu).

1.6.1. **Ebulioskopija**

Skatīt papildinājumu.

1.6.2. **Dinamiskā metode**

Skatīt tvaika spiediena noteikšanas A.4. metodi.

Reģistrē viršanas temperatūru, kas novērota 101,325 kPa spiedienā.

1.6.3. **Destilācijas metode (viršanas temperatūras intervāls)**

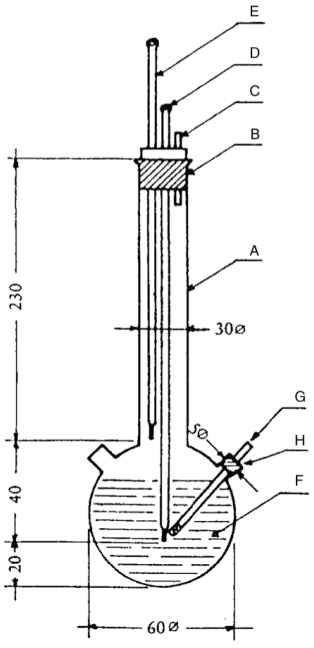
Skatīt papildinājumu.

1.6.4. **Sivolobova metode**

Apmēram 5 mm diametra parauga mēģenē ievietotu paraugu silda aparātā līdz viršanas temperatūrai (1. attēls).

Standartizēts kušanas temperatūras noteikšanas aparāts parādīts 1. attēlā. (JIS K 0064) (aparāts izgatavots no stikla, visi izmēri milimetros).

1. attēls



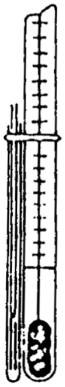
A: Mērīšanas trauks
B: Aizbāznis
C: Ventilācijas atvere
D: Termometrs
E: Papildu termometrs
F: Vannas šķidrums
G: Parauga mēģene ar ārējo diametru līdz 5 mm; tajā ievietots kapilārs – apmēram 100 mm garš, ar iekšējo diametru apmēram 1 mm un sieniņu biezumu no 0,2 līdz 0,3 mm
H: Sānu caurule

Caurulē ar paraugu ievieto kapilāru (viršanas kapilāru), kas aizkausēts apmēram 1 cm attālumā no apakšējā gala. Pārbaudāmās vielas līmenim jābūt tādam, lai kapilāra aizkausētais posms atrastos zem šķidruma virsmas. Cauruli ar paraugu un viršanas kapilāru piestiprina pie termometra ar tievu gumiju vai šim nolūkam izmanto sānu stiprinājumu (skatīt 2. attēlu).

▼B

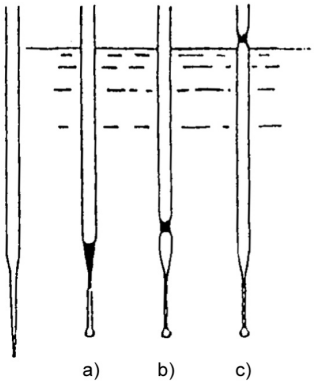
2. attēls

Sivolobova metodes princips



3. attēls

Modificētās metodes princips



Vannas šķidrumu izvēlas atkarībā no viršanas temperatūras. Temperatūrām līdz 573 K var izmantot silikoneļļu. Šķidro parafīnu var izmantot tikai temperatūrām līdz 473 K. Sākumā šķidrums vannā jāsilda ar ātrumu 3 K/min. Šķidrums vannā ir jāmaisa. Apmēram 10 K zemāk par sagaidāmo viršanas temperatūru sildīšanas intensitāti samazina tā, lai temperatūra paaugstinātos ne vairāk par 1 K/min. Tuvojoties viršanas temperatūrai, viršanas kapilārā sākas strauja burbuļu veidošanās.

Viršanas temperatūra ir temperatūra, kurā sākot dzesēšanu burbuļu veidošanās apstājas un kapilārā sākas strauja šķidruma līmeņa celšanās. Attiecīgais termometra rādījums atbilst vielas viršanas temperatūrai.

Pēc modificētās metodes (3. attēls) viršanas temperatūru nosaka, izmantojot kušanas temperatūras noteikšanai paredzēto kapilāru. To izstiepj, izveidojot apmēram 2 cm garu smailu galu (a), un tajā iesūc nelielu daudzumu parauga. Kapilāra vaļējo smailo galu aizkausē, atstājot pašā galā mazu gaisa burbuli. Sildot kušanas temperatūras noteikšanas aparātā (b), gaisa burbulis izplešas. Viršanas temperatūra atbilst temperatūrai, kurā viela sasniedz vannas šķidruma virsmu (c).

1.6.5. **Fotometriska noteikšana**

Kapilāru ar paraugu karsē, tam atrodoties sildāmā metāla blokā.

Caur attiecīgām atverēm blokā gaismas kūli caur vielu novada tālāk uz precīzi kalibrētu fotoelementu.

Paaugstinoties parauga temperatūrai, no viršanas kapilāra izdalās atsevišķi gaisa burbuļi. Sasniedzot viršanas temperatūru, ievērojami palielinās izdalījušos burbulīšu daudzums. Tas ietekmē gaismas intensitāti, ko reģistrē fotoelements, un mērierīce, kura nolasa platīna pretestības termometra temperatūru blokā, saņem stopsignālu.

Šī metode ir īpaši noderīga, jo tā ļauj veikt mērījumus, kad temperatūra ir zemāka par istabas temperatūru, līdz 253,15 K (–20 °C), nemainot pašu iekārtu. Aparāts tikai jāievieto vannā ar dzesēšanas šķidrumu.

▼B

1.6.6. **Termiskā analīze**

1.6.6.1. *Diferenciālā termiskā analīze*

Skatīt papildinājumu.

1.6.6.2. *Diferenciālā skenēšanas kalorimetrija*

Skatīt papildinājumu.

2. **DATI**

Ja novirzes no normālā atmosfēras spiediena ir nelielas (ne vairāk par ± 5 kPa), viršanas temperatūru standartizē līdz T_n pēc Sidneja-Janga vienādojuma:

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

kur:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [ievērot zīmi],

P = gaisa spiediena mērījums (kPa),

f_T = viršanas temperatūras izmaiņas atkarībā no temperatūras K/kPa,

T = izmērītā viršanas temperatūra (K),

T_n = viršanas temperatūra (K), kas koriģēta, ņemot vērā normālu atmosfēras spiedienu.

Temperatūras korekcijas koeficienti f, j un aproksimēšanas vienādojumi daudzām vielām norādīti iepriekšminētajos starptautiskajos un valstu standartos.

Piemēram, standartā DIN 53171 aplūkotās metodes aprakstā minēti šādi korekcijas koeficienti krāsu šķīdinātājiem:

2. tabula

TEMPERATŪRAS KOREKCIJAS KOEFICIENTI f_T

Temperatūra T (K)	Korekcijas koeficients 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	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta,

— precizitātes novērtējums.

Par viršanas temperatūru uzdod divu tādu mērījumu rezultātu vidējo vērtību, kuri ir novērtētās precizitātes (skatīt 1. tabulu) robežās.

Norāda spiedienu kPa, kādā mērīta viršanas temperatūra un noteikta tās vidējā vērtība. Spiedienam jābūt iespējami tuvu normālajam atmosfēras spiedienam.

Jāiekļauj jebkura informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, Vol. II.

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

▼B

Papildinājums

Papildus tehniskie dati ir ietverti, piemēram, šādos standartos:

1. **Ebulioskops**

1.1. Kušanas temperatūras noteikšanas ierīces ar šķidruma vannu

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

2. **Destilācijas metode (viršanas temperatūras intervāls)**

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	Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation:determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenciālā thermiskā analīze un diferenciālā skenēšanas kalorimetrija**

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. RELATĪVAIS BLĪVUMS

1. METODE

Aplūkotās metodes balstās uz ESAO Testēšanas norādījumiem (1). Pamatprincipi aprakstīti literatūras avotā (2).

1.1. IEVADS

Aprakstītās metodes relatīvā blīvuma noteikšanai ir derīgas cietām vielām un šķidrumiem neatkarīgi no tīrības pakāpes. Izmantojamās metodes ir uzskaitītas 1. tabulā.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Relatīvais blīvums vielām un šķidrumiem ir vielas tilpuma masas pie 20 °C un tāda paša tilpuma ūdens masas pie 4 °C attiecība. Relatīvais blīvums ir bezdimensiju lielums.

Vielas blīvums P ir tās masas m un tilpuma v attiecība.

Blīvuma p mērvienība SI sistēmā ir kg/m^3.

1.3. STANDARTVIELAS (1) (3)

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. METOŽU PRINCIPS

Izmanto četru veidu metodes.

1.4.1. **Flotācijas metodes**

1.4.1.1. *Areometrs* (šķidrām vielām)

Pietiekami precīzi un ātri blīvumu var noteikt ar iegremdējamiem areometriem, pēc kuriem šķidruma blīvumu nolasa pēc areometra graduētās daļas skalas iegrimes.

1.4.1.2. *Hidrostatiskie svari* (šķidrumiem un cietām vielām)

Blīvuma noteikšanai var izmantot nosakāmās vielas masas starpību, kas noteikta gaisā un piemērotā šķidrumā (piemēram, ūdenī).

Cietām vielām blīvuma mērījumu rezultāti attiecināmi tikai uz vienu konkrētu paraugu. Šķidrumu blīvuma noteikšanai zināma tilpuma (v) ķermeni vispirms nosver gaisā un tad šķidrumā.

1.4.1.3. *Iegremdētā ķermeņa metode* (šķidrumiem) (4)

Ar šo metodi šķidruma blīvumu nosaka pēc svērumu starpības pirms un pēc zināma tilpuma ķermeņa iegremdēšanas šķidrumā, kura blīvums jānosaka.

▼B

1.4.2. **Piknometriskās metodes**

Cietām vielām un šķidrumiem var izmantot dažādas formas un zināma tilpuma piknometrus. Blīvumu aprēķina pēc pilna un tukša piknometra masas starpības, ņemot vērā tā tilpumu.

1.4.3. **Piknometrs salīdzināšanai ar gaisu** (cietām vielām)

Jebkuras formas cietvielas blīvumu istabas temperatūrā var noteikt ar gāzu salīdzināšanas piknometru. Vielas tilpumu mēra gaisā vai inertā gāzē, to ievietojot kalibrētā cilindrā ar mainīgu tilpumu. Lai aprēķinātu blīvumu, pēc tilpuma mērījumiem paraugs vienreiz jānosver.

1.4.4. **Oscilāciju densimetrs** (5) (6) (7)

Šķidrumu blīvumu var mērīt ar oscilāciju densimetru. U-veida caurules mehānisko oscilatoru iesvārsta ar oscilatora rezonanses frekvenci, kas ir atkarīga no tā masas. Tajā ievadot paraugu, mainās oscilatora rezonanses frekvence. Šo ierīci kalibrē, izmantojot divus šķidrumus ar zināmu blīvumu. Ieteicams izvēlēties tādas vielas, kuru blīvums aptver visu mērījumu diapazonu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Tabulā ir apkopotas dažādas metodes, ko izmanto relatīvā blīvuma noteikšanai, norādot to izmantošanas iespējas.

1.6. METOŽU APRAKSTI

Piemēru veidā papildinājumā minētajos standartos atrodama papildu tehniskā informācija.

Noteikšana jāveic 20 ^{o}C temperatūrā, izdarot vismaz divus mērījumus.

2. **IEGŪTIE DATI**

Skatīt standartus.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— vielas precīzs apraksts (identifikācija un tīrība), iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta.

Relatīvais blīvums, D_4^{20}, jāuzdod saskaņā ar 1.2. punktu, norādot vielas agregātstāvokli.

Jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par vielas piemaisījumiem un tās agregātstāvokli.

▼B

Tabula

Metožu lietojamība

Mērīšanas metode	Blīvums		Maksimāli iespējamā dinamiskā viskozitāte	Standartmetode
	cietvielas	šķidrumi		
1.4.1.1. Areometrs		jā	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrostatiskie svari				
a) cietām vielām	jā			ISO 1183 (A)
b) šķidrumiem		jā	5 Pa s	ISO 901 un 758
1.4.1.3. Iegremdētā ķermeņa metode		jā	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknometrs				ISO 3507
a) cietām vielām	jā			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) šķidrumiem		jā	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Piknometrs salīdzināšanai ar gaisu	jā			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscilāciju densimetrs		jā	5 Pa s	

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, Vol. II, 427–430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, Vol. 19, p. 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, p. 717–726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Braureilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, Vol. 9, p. 253-255.

▼B

Papildinājums

Papildu tehniskie dati ir, piemēram, šādos standartos:

1. **Flotācijas metodes**

1.1. Areometrs

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. Hidrostatiskie svari

Cietām vielām

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

Šķidrumiem

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 un 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. Iegremdētā ķermeņa metode

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

2. **Piknometra metodes**

2.1. Šķidrumiem

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 ^{o}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} m^2 s^{-1} at 15 ^{o}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 ^{o}C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 ^{o}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.	Cietām vielām	
	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.	**Piknometrs salīdzināšanai ar gaisu**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. TVAIKA SPIEDIENS

1. METODE

Šī metode ir ekvivalenta OECD TG 104 (2004).

1.1. IEVADS

Šajā A.4. metodes (1) pārstrādātajā versijā papildus ir iekļauta efūzijas metode – izotermiskā termogravimetrija, kas paredzēta tvaika spiediena noteikšanai vielām, kurām tas ir ļoti zems (līdz pat 10^{-10} Pa). Ņemot vērā vajadzību pēc noteikšanas metodēm, īpaši, lai noteiktu tvaika spiedienu vielām, kurām tas ir zems, tiek atkārtoti izvērtēti citi šie metodes paņēmieni izmantošanai citos spiediena intervālos.

Termodinamiskā līdzsvara apstākļos tīras vielas tvaika spiediens ir atkarīgs tikai no temperatūras. Pamatprincipu aprakstu sk. (2)(3).

Nevienu mērīšanas paņēmienu nevar izmantot visā tvaika spiedienu intervālā no mazāk kā 10^{-10} līdz 10^5 Pa. Šajā metodikā ir iekļautas astoņas tvaika spiediena mērīšanas metodes, kuras var izmantot dažādos tvaika spiediena intervālos. Metožu salīdzinājums, ņemot vērā to pielietojumu un mērījumu intervālu, dots 1. tabulā. Šīs metodes var izmantot tikai testēšanas apstākļos stabilu vielu tvaika spiediena noteikšanai. Ja šīs eksperimentālās metodes tehnisku iemeslu dēļ izmantot nevar, tvaika spiedienu var noteikt pēc aprēķina metodes, un ieteicamā aprēķinu metode ir aprakstīta pielikumā.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Vielas tvaika spiediens tiek definēts kā piesātināta tvaika spiediens virs cietas vai šķidras vielas.

Jāizmanto SI sistēmas spiediena mērvienība, t. i., paskāls (Pa). Citas agrāk izmantotas mērvienības un sakarības starp tām ir šādas:

1 tors	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atm	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

SI sistēmas temperatūras mērvienība ir kelvins (K). Temperatūru no Celsija skalas grādiem kelvinos pārrēķina pēc šādas formulas:

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

kur T ir temperatūra kelvinos jeb termodinamiskā temperatūra un t ir temperatūra pēc Celsija.

▼**M1**

1. tabula

Mērīšanas metode	Vielas		Novērtētā atkārtojamība	Novērtētā reproducējamība	Ieteicamais intervāls
	Cietas vielas	Šķidras vielas			
Dinamiskā metode	ar zemu kušanas temp.	Jā	līdz 25 % no 1 līdz 5 %	līdz 25 % no 1 līdz 5 %	10^3 Pa līdz 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa līdz 10^5 Pa
Statiskā metode	Jā	Jā	no 5 līdz 10 %	no 5 līdz 10 %	no 10 Pa līdz 10^5 Pa no 10^{-2} Pa līdz 10^5 Pa (1)
Izoteniskopa metode	Jā	Jā	no 5 līdz 10 %	no 5 līdz 10 %	no 10^2 Pa līdz 10^5 Pa
Efūzijas metode: tvaika spiediena svari	Jā	Jā	no 5 līdz 20 %	līdz 50 %	no 10^{-3} līdz 1 Pa
Efūzijas metode: Knudsena šūna	Jā	Jā	no 10 līdz 30 %	—	no 10^{-10} līdz 1 Pa
Efūzijas metode: izotermiskā termogravimetrija	Jā	Jā	no 5 līdz 30 %	līdz 50 %	no 10^{-10} līdz 1 Pa
Gāzes piesātināšanas metode	Jā	Jā	no 10 līdz 30 %	līdz 50 %	no 10^{-10} līdz 10^3 Pa
Rotējošā rotora metode	Jā	Jā	no 10 līdz 20 %	—	no 10^{-4} līdz 0,5 Pa

(1) Izmantojot kapacitātes manometru

1.3. METODES PRINCIPS

Kopumā tvaika spiedienu nosaka dažādās temperatūrās. Ierobežotā temperatūru intervālā tīras vielas tvaika spiediena logaritms ir apgriezti proporcionāls termodinamiskajai temperatūrai saskaņā ar vienkāršotu Klapeirona-Klauziusa vienādojumu.

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

kur:

p = tvaika spiediens (Pa)

ΔHv = iztvaikošanas siltums J mol^{-1}

R = gāzu universālā konstante 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatūra K

▼**M1**

1.4. STANDARTVIELAS

Standartvielas nav nepieciešamas. Tās galvenokārt izmanto metodes veiktspējas periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūtu rezultātu salīdzināšanai.

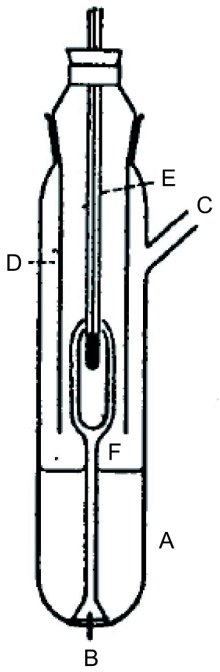
1.5. METODES APRAKSTS

1.5.1. **Dinamiskā metode (Kotrela metode)**

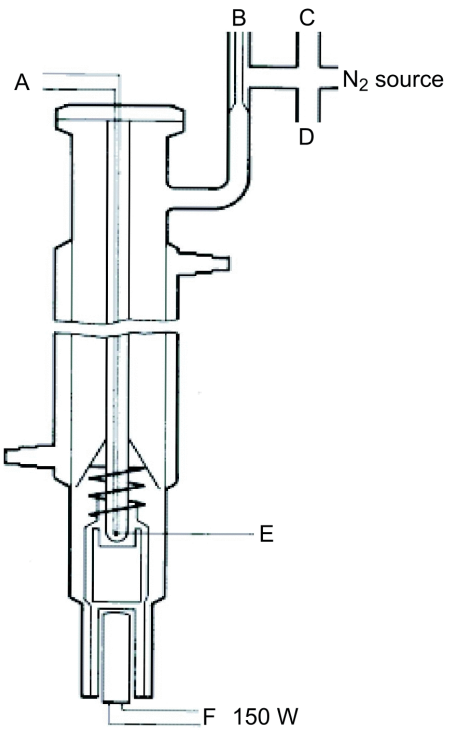
1.5.1.1. *Princips*

Tvaika spiedienu nosaka, mērot vielas vārīšanās temperatūru pie dažādiem spiedieniem aptuveni no 10^3 līdz 10^5 Pa. Šo metodi ir ieteicams izmantot arī viršanas temperatūras noteikšanai. Šajā nolūkā metodi ieteicams izmantot līdz 600 K. Hidrostatiskā spiediena dēļ šķidrumu viršanas temperatūra 3 līdz 4 cm dziļumā ir par aptuveni 0,1 °C augstāka nekā uz virsmas. Kotrela metodē (4) termometru novieto tvaikos virs šķidruma virsmas, un virstošais šķidrums nepārtraukti apskalo termometra rezervuāru. Rezervuāru pārklāj plāns šķidruma slānis, kas ir līdzsvarā ar tvaiku pie atmosfēras spiediena. Tādējādi termometrs uzrāda faktisko viršanas temperatūru bez kļūdām, ko rada šķidruma pārkaršana vai hidrostatiskais spiediens. Sūknis, kuru pirmo reizi izmantojis Kotrels, ir parādīts 1. att. Mēģenē A atrodas virstošais šķidrums. Pamatnē iekausētā platīna stieple B veicina vienmērīgu viršanu. Sānu caurulīte C ir savienota ar dzesinātāju, un apvalks D aukstajam kondensātam neļauj nokļūt pie termometra E. Šķidrumam A virstot, piltuves uztvertie burbuļi un šķidrums pa diviem sūkņa F zariem apskalo termometra rezervuāru.

1. attēls



2. attēls



▼**M1**

Kotrela sūknis (4)

A: Termopāris

B: Vakuuma bufertvertne

C: Manometrs

D: Vakuums

E: Mērīšanas punkts

F: Sildelements, apm. 150 W

1.5.1.2. *Aparatūra*

Ļoti precīzs aparāts, kas darbojas pēc Kotrela principa, parādīts 2. att. Tas sastāv no caurules ar viršanas sekciju apakšējā daļā, dzesinātāju vidusdaļā, kā arī izeju un uzmalu augšējā daļā. Kotrela sūkni ievieto viršanas sekcijā, ko silda ar elektrisko sildelementu. Temperatūru mēra, izmantojot termopāri apvalkā vai pretestības termometru, ko ievieto cauri uzmalai no augšas. Izeja savienota ar sistēmu spiediena regulēšanai. Tā sastāv no vakuumsūkņa, bufertvertnes, manostata spiediena regulēšanai, ievadot slāpekli, un manometra.

1.5.1.3. *Procedūra*

Vielu ievieto viršanas sekcijā. Problēmas var radīt cietas vielas, kas nav pulvera veidā, taču tās dažkārt var atrisināt ar dzesēšanas apvalka sildīšanu. Aparātu noslēdz pie uzmalas, un vielu atgāzo. Putojošām vielām šo metodi izmantot nevar.

Tad iestata zemāko nepieciešamo spiedienu un ieslēdz sildītāju. Tajā pašā laikā reģistrējošajai ierīcei pievieno temperatūras sensoru.

Līdzsvars tiek sasniegts, kad pastāvīgā spiedienā tiek reģistrēta nemainīga viršanas temperatūra. Īpaša uzmanība jāpievērš tam, lai novērstu pārkaršanu viršanas laikā. Bez tam dzesinātājā ir jāpanāk tvaiku pilnīga kondensācija. Nosakot tvaika spiedienu cietām vielām ar zemu kušanas temperatūru, jāraugās, lai tās nenosprostotu dzesinātāju.

Pēc līdzsvara punkta reģistrēšanas iestata augstāku spiedienu. Procesu šādi turpina, līdz tiek sasniegti 10^5 Pa (kopumā apmēram 5 līdz 10 mērījumu punkti). Pārbaudei līdzsvara punkti jāsasniedz, spiedienu pazeminot.

1.5.2. **Statiskā metode**

1.5.2.1. *Princips*

Statiskajā metodē (5) tvaika spiedienu termodinamiskā līdzsvara stāvoklī nosaka noteiktā temperatūrā. Šī metode piemērota tvaika spiediena noteikšanai vielām un daudzkomponentu maisījumiem, kas ir šķidras vai cietas vielas, intervālā no 10 līdz 10^5 Pa, un arī intervālā no 1 līdz 10 Pa ar nosacījumu, ka tiek veikti nepieciešamie pasākumi.

▼**M1**

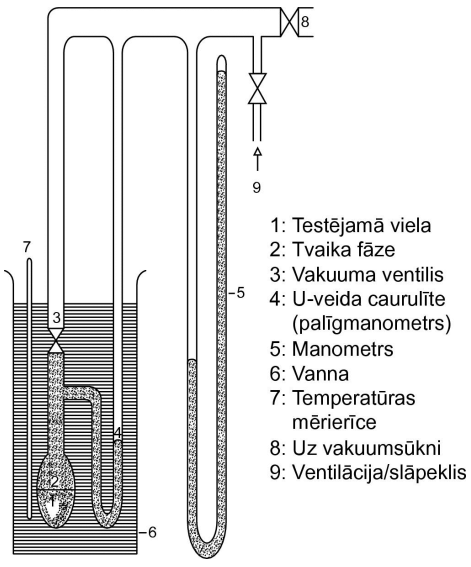
1.5.2.2. *Aparatūra*

Iekārta sastāv no vannas, kurā uztur pastāvīgu temperatūru (ar precizitāti ± 0,2 K), parauga konteinera, kas pievienots vakuuma līnijai, manometra un sistēmas spiediena regulēšanai. Parauga kamera (3a. attēls) ir pievienota vakuuma līnijai ar vārstu un diferenciālo manometru (U-veida caurulīti ar piemērotu manometra šķidrumu), ko izmanto par nulles indikatoru. Diferenciālajā manometrā atkarībā no spiedienu intervāla un testējamās vielas ķīmiskajām īpašībām var izmantot dzīvsudrabu, silikonus un ftalātus. Tomēr, rūpējoties par vidi, no dzīvsudraba izmantošanas būtu pēc iespējas jāizvairās. Testējamā viela nedrīkst ievērojami šķīst, kas ir U-veida caurulītē, vai ar to reaģēt. U-veida caurulītes vietā var izmantot manometru (3.b attēls). Manometrā dzīvsudrabu var izmantot intervālā no parastā atmosfēras spiediena līdz 10^2 Pa, bet silikona šķidrumi un ftalāti ir piemēroti spiedieniem, kas ir zemāki par 10^2 Pa līdz 10 Pa. Ir citi manometri, ko var izmantot, ja spiediens ir zemāks par 10^2 Pa, un sildāmās membrānas kapacitātes manometrus var izmantot pat tad, ja spiediens ir zemāks par 10^{-1} Pa. Temperatūru mēra uz trauka ārējās sienas, kurā atrodas paraugs, vai pašā traukā.

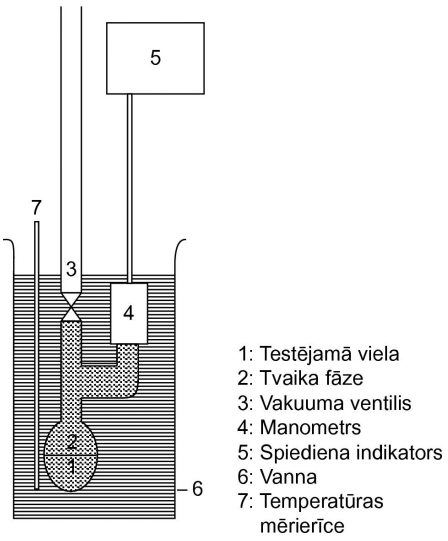
1.5.2.3. *Procedūra*

Izmantojot 3a. att. parādīto aparātu, uzpilda U-veida caurulīti ar izvēlēto šķidrumu, kas pirms mērījumiem paaugstinātā temperatūrā ir jāatbrīvo no gāzēm. Testējamo vielu ievieto aparātā un pazeminātā temperatūrā atbrīvo no gāzēm. Izmantojot daudzkomponentu paraugus, temperatūrai jābūt pietiekami zemai, lai nenotiktu materiāla sastāva izmaiņas. Līdzsvara iestāšanos paātrina ar maisīšanu. Paraugu var atdzesēt ar šķidro slāpekli vai sauso ledu, raugoties lai nenotiktu gaisa mitruma vai sūkņa šķidruma kondensācija. Virs parauga trauka atver vakuuma krānu un paraugu vairākas minūtes atgaiso ar vakuumu. Ja nepieciešams, atgaisošanu atkārto vairākas reizes.

3.a attēls



3.b attēls



▼**M1**

Sildot paraugu, kad krāns ir aizvērts, pieaug tvaika spiediens. Tādēļ izmainās šķidruma līdzsvars U-veida caurulītē. Lai to kompensētu, aparātā ievada slāpekli vai gaisu, līdz diferenciālais spiediena indikators atkal atrodas nulles stāvoklī. Tam nepieciešamo spiedienu nolasa ar manometru vai precīzāku instrumentu. Šis spiediens atbilst vielas tvaika spiedienam mērījuma temperatūrā. Izmantojot 3.b att. parādīto aparātu, tvaika spiedienu nosaka ar tiešiem mērījumiem.

Tvaika spiedienu līdz nepieciešamajai maksimālajai temperatūrai nosaka piemērotos nelielos temperatūras intervālos (kopumā apmēram 5 līdz 10 mērījumu punkti).

Pārbaudei jāatkārto nolasījumi zemās temperatūrās. Ja atkārtotos mērījumos noteiktās temperatūras neatbilst līknei, kas iegūta, temperatūru pakāpeniski paaugstinot, tam var būt šādi iemesli:

i) paraugā vēl ir gaiss (piemēram, izteikti viskozu materiālu gadījumā) vai arī vielas ar zemu viršanas temperatūru, kas izdalās sildīšanas laikā;

ii) izmantotajā temperatūras intervālā vielā ar vielu notiek ķīmiska reakcija (piemēram, sadalīšanās, polimerizācija).

1.5.3. **Izoteniskopa metode**

1.5.3.1. *Princips*

Izoteniskopā (6) izmanto statiskās metodes principu. Pēc šīs metodes vielas paraugu pārnes rezervuārā, kuram uztur nemainīgu temperatūru un ir savienots ar manometru un vakuumsūkni. Piemaisījumi, kuru gaistamība ir lielāka nekā testējamajai vielai, tiek atdalīti ar degazāciju pazeminātā spiedienā. Parauga tvaika spiediens izvēlētajā temperatūrā tiek līdzsvarots ar inertas gāzes zināmu spiedienu. Izoteniskops tika izstrādāts, lai noteiktu atsevišķu šķidro ogļūdeņražu tvaika spiedienu, tas ir piemērots arī cietu vielu analīzei. Metode parasti nav piemērota daudzkomponentu sistēmām. Ja paraugs satur negaistošus piemaisījumus, rezultātu kļūda ir neliela. Ieteicamais noteikšanas intervāls ir no 10^2 līdz 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Aparatūra*

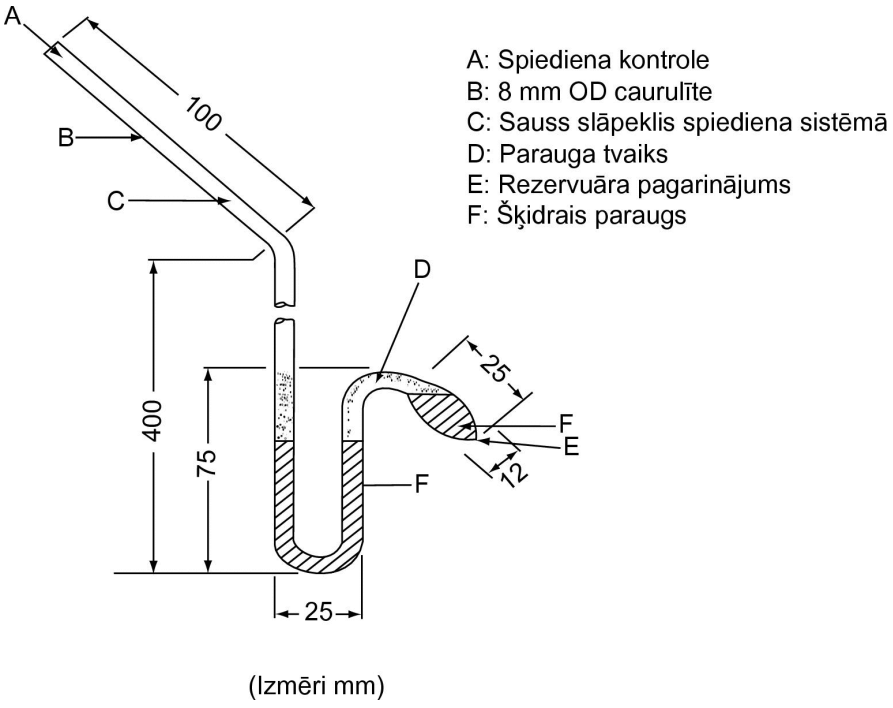
Mērinstrumenta paraugs parādīts 4. att. Pilnīgāks metodes apraksts ir atrodams ASTM D 2879–86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedūra*

Analizējot šķidrumu, pati viela kļūst par diferenciālā manometra šķidrumu. Izoteniskopā pārnes tik daudz šķidruma, lai piepildītu rezervuāru un manometra īso atzaru. Izoteniskopu pieslēdz vakuumam un atgaiso, tad piepilda ar slāpekli. Atbrīvošanu no gāzēm un attīrīšanu atkārto divas reizes, lai izdalītu atlikušo skābekli. Uzpildīto izoteniskopu novieto horizontāli tā, lai paraugs plānā slānī izklātu parauga rezervuāru un manometru. Sistēmā spiedienu samazina līdz 133 Pa, un paraugu uzmanīgi silda, līdz tas sāk vārīties (atbrīvošanai no izšķīdušajām gāzēm). Tad izoteniskopu novieto tā, lai paraugs ieplūstu atpakaļ rezervuārā un piepildītu manometra īso zaru. Uztur 133 Pa spiedienu. Parauga rezervuāra pagarināto galu ar nelielu liesmu silda, līdz sāk izdalīties un pietiekami izplešas testējamās vielas tvaiks, izspiežot daļu parauga no rezervuāra augšējās daļas manometra zarā, un izveidojas ar tvaiku pildīta telpa, kurā nav slāpekļa. Tad izoteniskopu novieto vannā, kurā uztur pastāvīgu temperatūru, un regulē slāpekļa spiedienu, līdz tas ir līdzsvarā ar testējamās vielas parauga tvaika spiedienu. Līdzsvara stāvoklī slāpekļa spiediens atbilst vielas tvaika spiedienam.

4. attēls



Cietām vielām atkarībā no spiediena un temperatūras intervāliem izmanto tādus manometra šķidrumus kā silikonus vai ftalātus. Degazēto manometra šķidrumu iepilda izcilnī uz izoteniskopa garā zara. Tad testējamo cieto vielu ievieto parauga rezervuārā un paaugstinātā temperatūrā degazē. Pēc tam izoteniskopu noliec tā, lai manometra šķidrums ieplūstu U-veida caurulītē.

▼M1

1.5.4. **Efūzijas metode: tvaika spiediena svari** (7)

1.5.4.1. *Princips*

Testējamās vielas paraugu karsē nelielā krāsnī, kas novietota zem kupola, no kura atsūknēts gaiss. Krāsnij ir vāks ar sīkiem noteikta diametra urbumiem. Vielas tvaiki, izplūstot pa vienu no urbumiem, tiek novirzīti uz ļoti jutīgu svaru kausu, kas arī atrodas zem kupola, no kura evakuēts gaiss. Dažās konstrukcijās svaru kausam, uz kura kondensējas izplūstošais tvaiks, ir dzesēšanas kamera, nodrošinot siltuma aizvadīšanu termiskās kondukcijas ceļā, un to atdzesē staro-jums. Tvaika strūklas enerģija darbojas kā spēks uz svariem. Tvaika spiedienu var aprēķināt divos veidos: tieši, ņemot vērā spēku, kas darbojas uz svaru kausu, un iztvaikošanas ātrumu, izmantojot Herca-Knudsena vienādojumu (2):

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

kur:

G = iztvaikošanas ātrums (kg s^{-1} m^{-2})

M = molmasa (g mol^{-1})

T = temperatūra (K)

R = gāzu universālā konstante (J mol^{-1} K^{-1})

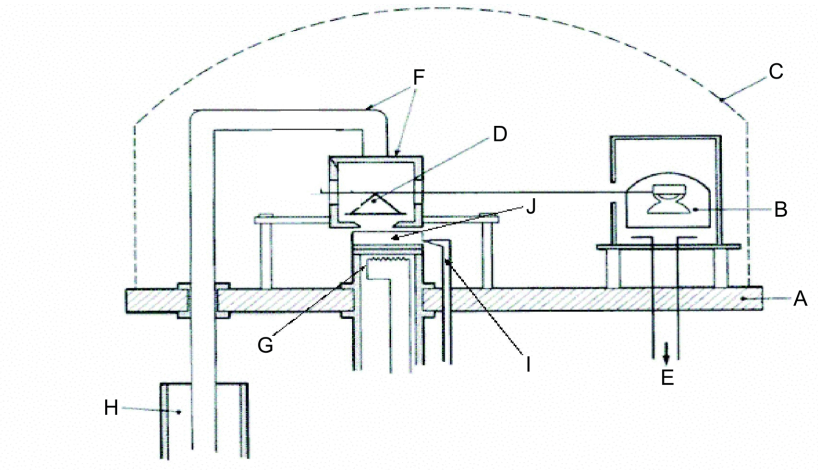
p = tvaika spiediens (Pa)

Ieteicamais noteikšanas intervāls ir no 10^{-3} līdz 1 Pa.

1.5.4.2. *Aparatūra*

Aparāta principiālo shēmu sk. 5. att.

5. attēls



A: Pamata plāksne

B: Mērinstruments ar kustīgu tinumu

C: Kupols

D: Svari ar svaru kausu

E: Vakuuma mērīšanas ierīce

F: Dzesēšanas kamera un dzesēšanas stienis

G: Iztvaicēšanas krāsns

H: Djuāra trauks ar šķidro slāpekli

I: Parauga temperatūras mērīšana

J: Testējamā viela

▼M1

1.5.5. **Efūzijas metode: Knudsena šūna**

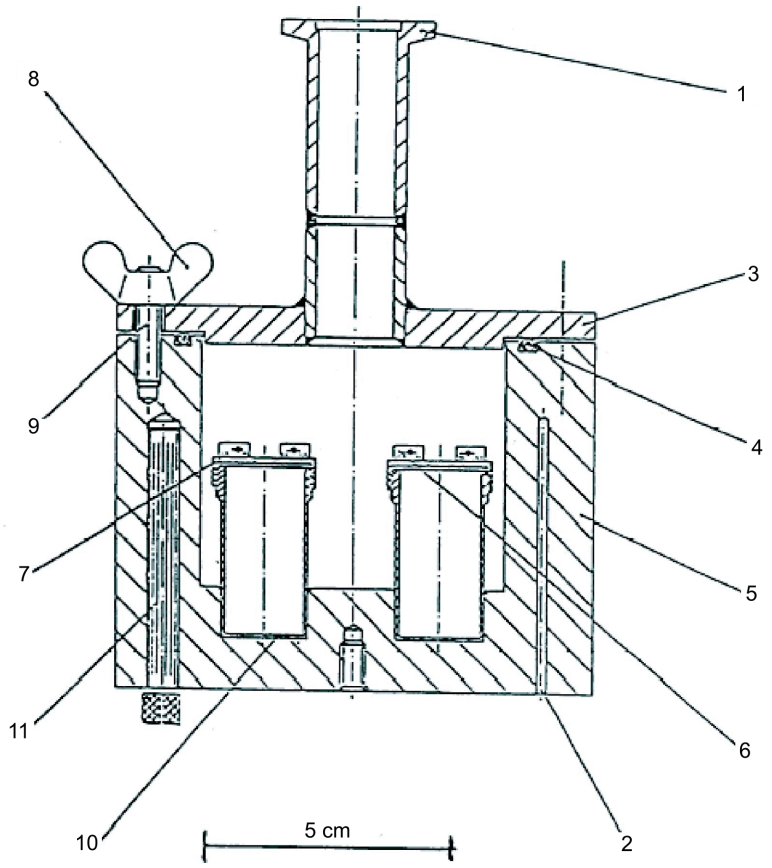
1.5.5.1. *Princips*

Metodes pamatā ir testējamās vielas masas noteikšana, kas ultravakuuma apstākļos laika vienībā tvaika veidā pa mikroatveri izplūst no Knudsena šūnas (8). Izplūdušā tvaika masu var noteikt pēc šūnas masas zuduma, vai vielas tvaikus zemā temperatūrā kondensējot un ar hromatogrāfiju nosakot iztvaicētās vielas daudzumu. Tvaika spiedienu aprēķina pēc Herca-Knudsena vienādojuma (sk. 1.5.4.1.) un izmantojot no aparāta parametriem atkarīgus korekcijas koeficientus (9). Ieteicamais noteikšanas intervāls ir no 10^{-10} līdz 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Aparatūra*

Aparāta principiālo shēmu sk. 6. att.

6. attēls



1:	Savienojums ar vakuumu	7:	Vāks ar vītni
2:	Platīna pretestības termometra vai temperatūras regulēšanas ierīces ligzdas	8:	Spārnuzgrieznis
3:	Vakuumkameras vāks	9:	Skrūves
4:	Blīve	10:	Nerūsējošā tērauda efūzijas šūnas
5:	Alumīnija vakuumkamera	11:	Sildelements
6:	Mehānisms efūzijas šūnu ievietošanai un izņemšanai		

▼**M1**

1.5.6. **Efūzijas metode: izotermiskā termogravimetrija**

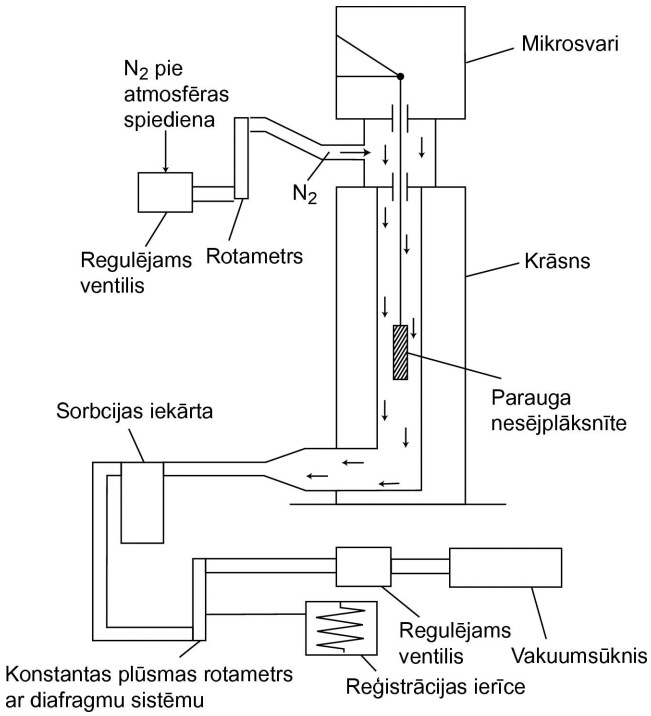
1.5.6.1. *Princips*

Šīs metodes pamatā ir testējamās vielas palielināta iztvaikošanas ātruma noteikšana paaugstinātās temperatūrās pie atmosfēras spiediena, izmantojot termogravimetriju (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Iztvaikošanas ātrumi v_T tiek iegūti, uz testējamo vielu iedarbojoties ar lēnu inertas gāzes plūsmu un atbilstošos laika periodos nosakot masas zudumus izotermiskos apstākļos pie definētajām temperatūrām T (kelvinos). Tvaika spiedienus p_T aprēķina no v_T vērtībām, izmantojot lineāru sakarību starp tvaika spiediena logaritmu un iztvaikošanas ātruma logaritmu. Ja nepieciešams, izmantojot log p_T regresiju atkarībā no 1/T, var veikt ekstrapolāciju 20 un 25 °C. Šī metode ir piemērota vielām, kuru tvaika spiediens ir pat 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) un tīrības pakāpe ir iespējami tuvu 100 %, lai izvairītos no kļūdām noteikto masas zudumu interpretācijā.

1.5.6.2. *Aparatūra*

Eksperimentālās iekārtas principiālā shēma 7. att.

7. attēls



Parauga nesējplāksnīti, kas piekārta mikrosvariem kamerā ar kontrolējamu temperatūru, izkustina sausa gāzveida slāpekļa plūsma, kas nes iztvaicētās testējamās vielas molekulas. Izplūstot no kameras, vielu sorbcijas iekārtā uztver no gāzes plūsmas.

1.5.6.3. *Procedūra*

Testējamo vielu homogēnā slānī uzklāj uz stikla plāksnītes ar nelīdzenu virsmu. Analizējot cietas vielas, plāksni vienmērīgi samitrina ar vielas šķīdumu piemērotā šķīdinātājā un žāvē inertā atmosfērā. Lai veiktu mērījumus, pārklāto plāksni piekar termogravimetriskajā analizatorā, un pēc tam masas zudumus mēra nepārtraukti kā laika funkciju.

▼M1

Iztvaikošanas ātrumu v_T noteiktā temperatūrā aprēķina, izmantojot parauga plāksnes masas zudumu Δm

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

kur F ir ar testējamo vielu pārklātās plāksnītes virsmas laukums, parasti parauga plāksnītes virsmas laukums, un t – laiks, kurā novēro masas zudumu Δm.

Tvaika spiedienu p_T aprēķina kā funkciju no iztvaikošanas ātruma v_T:

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

kur C un D ir ar izmantoto eksperimentālo iekārtu saistītas konstantes, kas atkarīgas no mērījumu kameras diametra un gāzes plūsmas ātruma. Šīs konstantes jānosaka vienreiz, analizējot vairākus savienojumus ar zināmu tvaika spiedienu un aprēķinot log p_T regresiju atkarībā no log v_T (11)(21)(22).

Tvaika spiedienu p_T atkarībā no temperatūras T (kelvinos) apraksta ar sakarību

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

kur A un B ir konstantes, ko nosaka, aprēķinot log p_T regresiju pēc 1/T. Izmantojot šo vienādojumu, ar ekstrapolāciju var aprēķināt tvaika spiedienu jebkurā citā temperatūrā.

1.5.7. **Gāzes piesātināšanas metode** (23)

1.5.7.1. *Princips*

Pār testējamo vielu istabas temperatūrā laiž inertas gāzes plūsmu ar noteiktu ātrumu, kas ir pietiekami mazs, lai nodrošinātu gāzes piesātināšanos. Gāzes fāzes piesātinājumam ir būtiska nozīme. Pārnesto vielu uztver, parasti izmantojot sorbentu, un nosaka tās daudzumu. Kā alternatīvu tvaika sorbcijai un tai sekojošai vielas daudzuma noteikšanai var izmantot analītiskās metodes, kurās notiek vielas pārnese, piemēram, gāzu hromatogrāfiju, lai kvantitatīvi noteiktu pārnestās vielas daudzumu. Tvaika spiedienu aprēķina pieņemot, ka ir spēkā ideālas gāzes likums, un tāpēc gāzu maisījuma kopējais spiediens ir vienāds ar tās atsevišķo komponentu spiedienu summu. Testējamās vielas parciālo spiedienu, t. i., tvaika spiedienu, aprēķina, zinot gāzes kopējo tilpumu un tās pārnestās vielas masu.

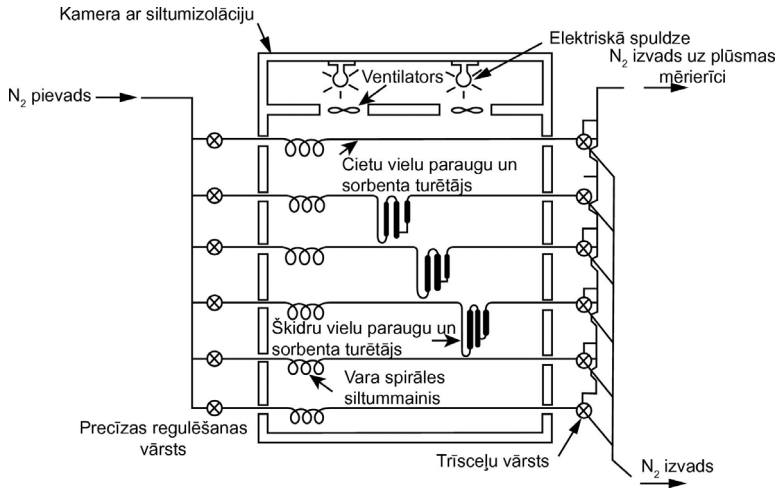
Gāzes piesātināšanas metode ir izmantojama vielām šķidru un cietu vielu veidā. To var izmantot pat tik zema tvaika spiediena noteikšanai kā 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Šī metode ir drošākā tvaika spiedieniem, kas ir zemāki par 10^3 Pa. Virs 10^3 Pa noteiktās tvaika spiediena vērtības parasti ir paaugstinātas, iespējams, aerosolu veidošanās dēļ. Tā kā tvaika spiedienu mēra istabas temperatūrā, nav nepieciešams ekstrapolēt paaugstinātās temperatūrās iegūtus datus, kas bieži rada nopietnas kļūdas.

1.5.7.2. *Aparatūra*

Jāizmanto kamera, kurā uztur pastāvīgu temperatūru. Shēmā 8. att. parādīta kamera ar trijiem cietu vielu un trijiem šķidru vielu paraugu turētājiem, kas dod iespējas veikt cietas vai šķidras vielas parauga analīzi trijos atkārtojumos. Temperatūru uztur ar precizitāti vismaz ± 0,5 °C vai ar augstāku precizitāti.

▼**M1**

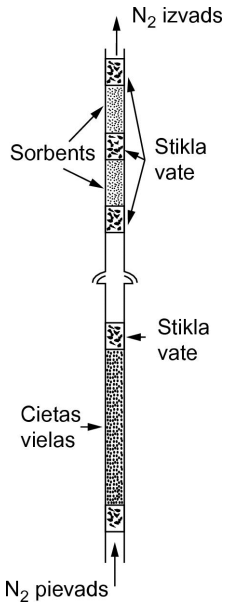
8. attēls



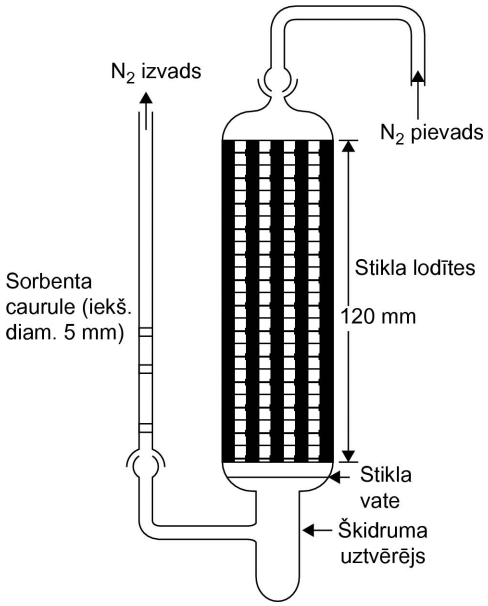
Parasti par inertu nesējgāzi izmanto slāpekli, taču atsevišķos gadījumos var būt nepieciešama cita gāze (24). Nesējgāzei jābūt sausai. Gāzes plūsmu, ko regulē ar adatvārstiem (apm. 0,79 mm atvere), sadala 6 daļās un pa vara caurulīti ar iekšējo diametru 3,8 mm ievada kamerā. Pēc temperatūras līdzsvarošanas gāze plūst cauri paraugam, uztvērējam ar sorbentu un izplūst ārā no kameras.

Cietās vielas paraugu ievieto stikla caurulītē ar iekšējo diametru 5 mm, un tās abus galus noslēdz ar stikla vates aizbāžņiem (sk. 9. att.). Šķidru vielu paraugu turētājs un sorbcijas sistēma parādīta 10. att. Labāk reproducējamus šķidrumu tvaika spiediena mērījumu rezultātus iegūst, ja turētāju piepilda ar stikla lodītēm vai inertu sorbentu, piemēram, silīcija dioksīdu, uz kuru virsmas uznesta šķidra viela. Otra iespēja ir nesējgāzi laist cauri rupjam fritam un barbotēt caur testējamo vielu, kas ir šķidruma veidā.

9. attēls



10. attēls



▼M1

Sorbcijas sistēmā ir plūsmai pretējā un aizmugurējā sorbenta daļa. Pie ļoti zema tvaika spiediena sorbents vielu aiztur tikai nelielā daudzumā, un par nopietnu problēmu var kļūt adsorbcija uz stikla vates un stikla caurulītes sieniņām posmā starp paraugu un sorbentu.

Cits efektīvs iztvaicētās vielas uztveršanas paņēmiens ar izmantot uztvērēju, ko dzesē ar cietu CO_2. Tas nerada pretspiedienu uz piesātināšanas kolonnas, un uztvertā viela ir kvantitatīvi vienkārši pārnesama.

1.5.7.3. *Procedūra*

Nesējgāzes plūsmas ātrumu mēra istabas temperatūrā. Plūsmas ātrumu eksperimenta laikā kontrolē pietiekami bieži, lai nodrošinātu, ka nesējgāzes tilpums tiek noteikts precīzi. Ieteicams veikt nepārtrauktus masas plūsmas mērījumus. Gāzes fāzes piesātināšanai var būt vajadzīgs visai ilgs kontakta laiks, un tāpēc pavisam neliels gāzes plūsmas ātrums (25).

Eksperimenta beigās priekšējo un aizmugurējo sorbenta daļu analizē atsevišķi. Vielu no katras sorbenta daļas atsevišķi desorbē ar šķīdinātāju. Iegūtajos šķīdumos kvantitatīvi nosaka no abām sorbenta daļām desorbētās vielas masu. Analītiskās metodes izvēle (arī sorbenta un desorbcijas šķīdinātāja izvēle) ir atkarīga no testējamās vielas īpašībām. Desorbcijas efektivitāti novērtē, noteikta lieluma paraugu pārnesot uz sorbenta, desorbējot un nosakot atgūstamību. Desorbcijas efektivitāte jāpārbauda, izmantojot parauga koncentrāciju testēšanas apstākļos, vai tai iespējami līdzīgu koncentrāciju.

Lai pārliecinātos par nesējgāzes piesātināšanos ar testējamo vielu, noteikšanu veic pie trijiem atšķirīgiem gāzes plūsmas ātrumiem. Ja aprēķinātais tvaika spiediens nav atkarīgs no plūsmas ātruma, gāzi uzskata par piesātinātu.

Tvaika spiedienu aprēķina pēc šāda vienādojuma:

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

kur:

p = tvaika spiediens (Pa)

W = iztvaikojušās testējamās vielas masa (g)

V = piesātinātas gāzes tilpums (m^3)

R = gāzu universālā konstante 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatūra (K)

M = testējamās vielas molmasa (g mol^{-1})

Jāveic izmērītā tilpuma korekcija, ņemot vērā spiediena un temperatūras atšķirības plūsmas mērīšanas ierīcē un piesātināšanas kamerā.

▼M1

1.5.8. **Rotējošā rotora metode**

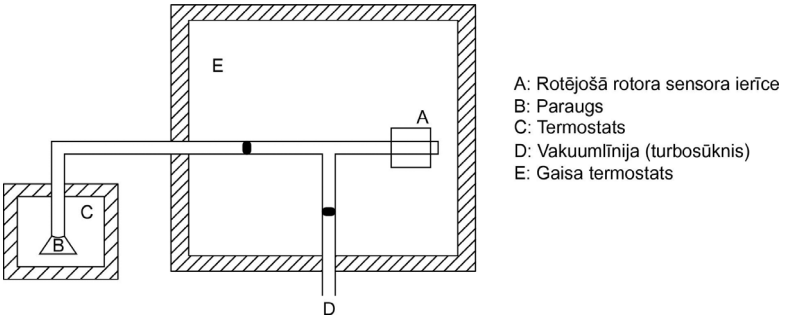
1.5.8.1. *Princips*

Šajā metodē izmanto rotējošā rotora viskozimetru, kurā mērelements ir magnētiskajā laukā piekārta neliela izmēra tērauda lodīte, kas griežas rotējošā laukā (26)(27)(28). Uztveršanas spoles ļauj noteikt rotācijas ātrumu. Kad lodīte ir sasniegusi noteikto rotācijas ātrumu, parasti apmēram 400 apgr./s, aktivāciju pārtrauc, un ātrums sāk palēnināties gāzes radītās berzes dēļ. Rotācijas ātruma samazināšanos mēra kā laika funkciju. Tvaika spiedienu nosaka pēc tērauda lodītes palēninājuma, kas atkarīgs no spiediena. Ieteicamais noteikšanas intervāls ir no 10^{-4} līdz 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparatūra*

Eksperimentālās iekārtas shematisks zīmējums parādīts 11. att. Mērelements ir apvalkā ar pastāvīgu temperatūru, ko regulē ar 0,1 °C precizitāti. Parauga konteineru ievieto atsevišķā apvalkā, kurā arī regulē temperatūru ar 0,1 °C precizitāti. Visās pārējās iekārtas daļās tiek uzturēta augstāka temperatūra, lai novērstu kondensāciju. Visa aparatūra ir pievienota sistēmai, kas tajā rada dziļu vakuumu.

11. attēls



2. **REZULTĀTI UN PĀRSKATS**

2.1. REZULTĀTI

Tvaika spiediens, izmantojot jebkuru no minētajām metodēm, jānosaka vismaz divās temperatūrās. Ieteicams izmantot trīs vai vairāk temperatūras intervālā no 0 līdz 50 °C, lai pārbaudītu tvaika spiediena līknes linearitāti. Izmantojot efūzijas metodi (Knudsena šūnu, izotermisko termogravimetriju) un gāzes piesātināšanas metodi, ieteicamais noteikšanas temperatūru intervāls ir nevis 0 līdz 50 °C, bet gan 120 līdz 150 °C.

2.2. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

— izmantotā metode,

▼M1

— vielas precīzs apraksts (identitāte un piemaisījumi) un attīrīšanas paņēmieni, ja to veic,

— vismaz divas tvaika spiediena un temperatūras vērtības – un ieteicams trīs vai vairāk – intervālā no 0 līdz 50 °C (vai 120 līdz 150 °C),

— vismaz vienai temperatūrai ir jābūt 25 °C vai par to zemākai, ja tas ir iespējams saskaņā ar izvēlēto metodi,

— visi izejas dati,

— log p pret 1/T līkne,

— aprēķinātais tvaika spiediens 20 vai 25 °C temperatūrā.

Ja novērojamas testējamās vielas pārvērtības (agregātstāvokļa maiņa, sadalīšanās), jānorāda šāda informācija:

— pārvērtības veids;

— temperatūra, kurā pārvērtība notiek pie atmosfēras spiediena;

— tvaika spiediens 10 un 20 °C zem izmaiņu temperatūras un 10 un 20 °C virs šīs temperatūras (izņemot, ja ir pāreja no cieta agregātstāvokļa gāzveida stāvoklī).

Jānorāda visa rezultātu interpretācijai nepieciešamā informācija, īpaši ziņas par piemaisījumiem un vielas fizikālo stāvokli.

3. **LITERATŪRA**

(1) *Eiropas Kopienu Oficiālais Vēstnesis* 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

Papildinājums

Aprēķina metode

IEVADS

Pēc aprēķina metodes noteiktās tvaika spiediena vērtības var izmantot:

— lai izvēlētos piemērotākās eksperimentālās metodes;

— aptuvenas vērtības vai robežvērtības noteikšanai gadījumos, kad eksperimentālā metode nav izmantojama tehnisku iemeslu dēļ.

APRĒĶINA METODE

Šķidru un cietu vielu tvaika spiedienu var aprēķināt, izmantojot modificētu Vatsona korelāciju (a). Eksperimentāli jānosaka tikai viršanas punkts normālos apstākļos. Šī metode ir piemērota tvaika spiediena aprēķināšanai, kas ir intervālā no 10^5 Pa līdz 10^{-5} Pa.

Detalizēta informācija par metodi ir sniegta "*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*" (b). Sk. arī *OECD Environmental Monograph No 67* (c).

APRĒĶINĀŠANA

Tvaika spiedienu aprēķina pēc formulas:

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

kur:

T = temperatūra, kurai aprēķina tvaiku spiedienu

T_b = viršanas punkts normālos apstākļos

P_{vp} = tvaika spiediens temperatūrā T

ΔH_{vb} = iztvaikošanas siltums

ΔZ_b = saspiežamības faktors (novērtēts kā 0,97)

m = empīrisks koeficients, kas atkarīgs no vielas fizikālā stāvokļa attiecīgajā temperatūrā

Turklāt

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

kur K_F ir empīrisks koeficients, kas ir atkarīgs no vielas polaritātes. Vairākiem savienojumu tipiem K_F koeficienti norādīti literatūras avotā (b).

▼**M1**

Bieži ir pieejami dati par viršanas punktu pazeminātā spiedienā. Šajā gadījumā tvaika spiedienu aprēķina:

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

kur T_1 ir viršanas punkts pazeminātā spiedienā P_1.

PĀRSKATS

Izmantojot aprēķina metodi, pārskatā pilnībā jādokumentē viss aprēķins.

LITERATŪRA

(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. VIRSMAS SPRAIGUMS

1. METODE

Aprakstīto metožu pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1). Pamatprincipi aprakstīti literatūras avotā (2).

1.1. IEVADS

Aplūkotās metodes paredzētas ūdens šķīdumu virsmas spraiguma mērīšanai.

Pirms šo pārbaužu veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš ievākt datus par pārbaudāmās vielas šķīdību ūdenī, tās uzbūvi, hidrolīzes īpašībām un micellu veidošanās robežkoncentrāciju.

Šeit aprakstītās metodes ir izmantojamas gandrīz visām ķīmiskajām vielām neatkarīgi no to tīrības.

Ar gredzenveida tenzometru var noteikt virsmas spraigumu tikai tādiem ūdens šķīdumiem, kuru dinamiskā viskozitāte ir zemāka par 200 mPa s.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Virsmas spraigums ir virsmas brīvā entalpija uz virsmas laukuma vienību.

Virsmas spraigumam ir šādas mērvienības:

N/m (SI mērvienība) vai

mN/m (SI apakšmērvienība),

1 N/m = 10^3 dini/cm,

1 mN/m = 1 dins/cm novecojušajā cgs mērvienību sistēmā.

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

Standartvielas, kuru virsmas spraigums aptver plašu diapazonu, ir uzskaitītas izmantotās literatūras sarakstā (1) (3).

1.4. METOŽU PRINCIPS

Ar šīm metodēm nosaka maksimālo spēku, kas vertikāli jāpieliek cilpai vai gredzenam, kurš ir saskarē ar pārbaudāmā šķidruma virsmu mērtraukā, lai to atrautu no šīs virsmas, vai spēku, kas jāpieliek plātnei, kuras mala pieskaras šķidruma virsmai, lai pievilktu izveidojušos virsmas slāni.

Vielas, kuras ir šķīstošas ūdenī koncentrācijā vismaz līdz 1 mg/l, testē ūdens šķīdumā vienā koncentrācijā.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Šīm metodēm ir augstāka precizitāte par vides novērtējumam vajadzīgo.

▼B

1.6. METOŽU APRAKSTI

Vielu izšķīdina destilētā ūdenī. Šķīduma koncentrācijai jābūt 90 % no vielas piesātināta šķīduma koncentrācijas; ja šī koncentrācija ir lielāka par 1 g/l, noteikšanu veic šķīdumam ar koncentrāciju 1 g/l. Virsmas spraigums nav jānosaka vielām, kuru šķīdība ir mazāka par 1 mg/l.

1.6.1. **Plātnes metode**

Skatīt ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas – virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.2. **Cilpas metode**

Skatīt ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas – virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.3. **Gredzena metode**

Skatīt ISO 304 un NF T 73-060 (Virsmaktīvās vielas – virsmas spraiguma noteikšana, izmantojot šķidrumu plēvītes).

1.6.4. **ESAO gredzena metode**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Šo mērījumu veikšanai der pārdošanā esošie tenzometri. Šīs ierīces sastāv no šādiem mezgliem:

— grozāma parauga plate,

— dinamometrs,

— mērierīce (gredzens),

— mērtrauks.

1.6.4.1.1. Grozāma parauga plate

Grozāmo plati izmanto kā paliktni termostatējamam mērtraukam, kurā iepilda pārbaudāmo šķidrumu. Tas ir piestiprināts pie statīva kopā ar dinamometru.

1.6.4.1.2. Dinamometrs

Dinamometrs (skatīt attēlu) atrodas virs parauga plates. Spēka mērījumu kļūda nedrīkst būt lielāka par ± 10^{-6} N, kas atbilst masas mērījumu kļūdai ± 0,1 mg. Pārdošanā esošo tenzometru mērījumu skala lielākoties kalibrēta mN/m mērvienībās, kas ļauj nolasīt virsmas spraiguma rādījumus tieši mN/m ar 0,1 mN/m precizitāti.

▼B

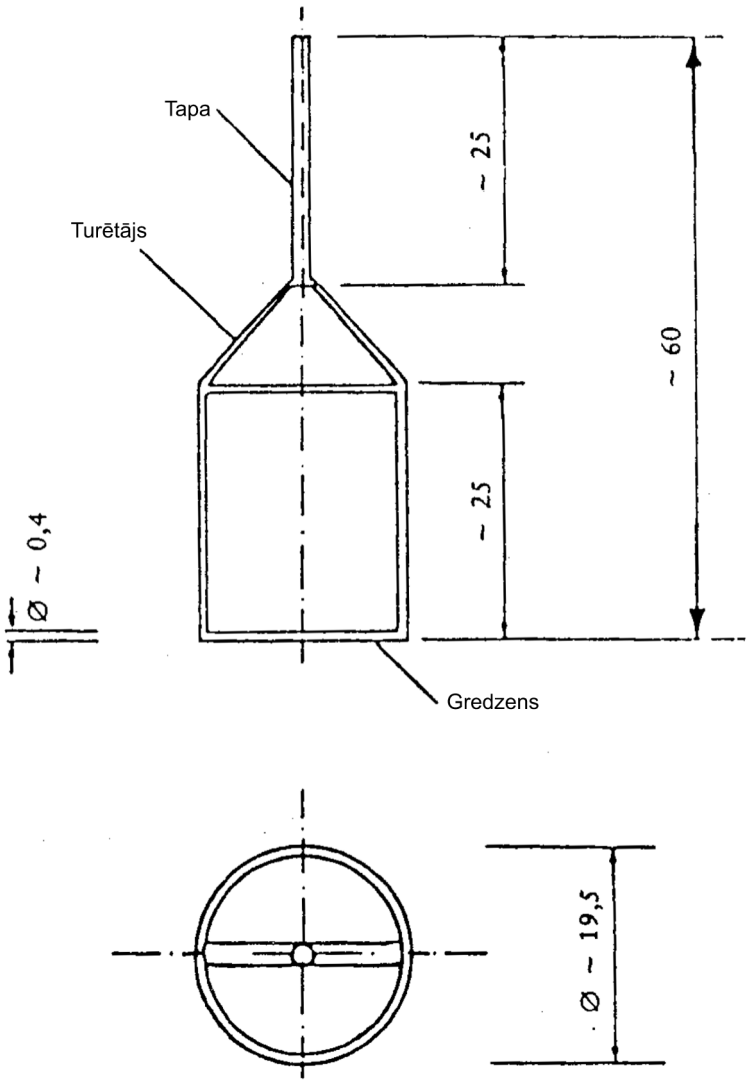
1.6.4.1.3. Mērierīce (gredzens)

Gredzenu parasti izgatavo no platīna-indija sakausējuma 0,4 mm stieples, un tā vidējais apkārtmērs ir 60 mm. Stieple parasti ir pacelta horizontālā virzienā no metāla tapas un stieples turētāja, lai izveidotu savienojumu ar dinamometru (skatīt attēlu).

Attēls

Mērierīce

(Visi izmēri norādīti milimetros)



1.6.4.1.4. Mērtrauks

Mērtraukam, kurā ir pārbaudāmais šķīdums, jābūt izgatavotam no stikla, un tam jābūt termostatējamam. Mērījumu laikā tā konstrukcijai jānodrošina nemainīga temperatūra pārbaudāmā šķīduma šķidrajā fāzē un gāzes fāzē (virs tās) un jānovērš parauga iztvaikošana. Šim nolūkam der stikla cilindri ar iekšējo diametru ne mazāku par 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Iekārtas sagatavošana*

1.6.4.2.1. T ī r ī š a n a

Rūpīgi jāgādā par stikla trauku tīrību. Vajadzības gadījumā tos mazgā ar bihromāta šķīdumu un pēc tam ar sīrupveidīgu fosforskābi (83–98 masas % H_3PO_4), tad rūpīgi skalo ūdensvada ūdenī un visbeidzot skalo ar bidestilātu, kamēr iegūst neitrālu reakciju, un tad traukus žāvē vai skalo ar pārbaudāmo šķidrumu.

Gredzenu vispirms rūpīgi skalo ūdenī, lai atbrīvotos no ūdenī šķīstošām vielām, tad uz īsu brīdi to iegremdē bihromāta šķīdumā, skalo bidestilātā, kamēr iegūst neitrālu reakciju, un visbeidzot īslaicīgi karsē virs degoša metanola liesmas.

Piezīme

No tādiem piemaisījumiem, kas nešķīst un nesadalās bihromāta šķīdumā vai fosforskābē, piemēram, no silikoniem, atbrīvojas, izmantojot piemērotu organisku šķīdinātāju.

1.6.4.2.2. I e k ā r t a s k a l i b r ē š a n a

Iekārtu sagatavojot mērīšanai, pārbauda nulles punktu un to noregulē tā, lai instrumenta rādījumi ļautu iegūt ticamus virsmas spraiguma mērījumu rezultātus mN/m.

Uzstādīšana

Iekārtu novieto horizontāli uz tenzometra pamatnes, piemēram, izmantojot līmeņrādi un regulējot līmeņotājskrūves pamatnē.

Nulles punkta iestatīšana

Pēc gredzena uzstādīšanas un pirms tā iegremdēšanas šķidrumā tenzometram iestata nulles punktu un pārliecinās, ka gredzena plakne ir paralēla šķidruma virsmai. Šim nolūkam šķidruma virsmu var izmantot kā spoguli.

Kalibrēšana

Iekārtas kalibrēšanu var veikt divējādi:

a) ar atsvariem: izmantojot uz gredzena novietotus atsvaru jātniecinus ar masu no 0,1 g līdz 1,0 g. Kalibrēšanas koeficientu Φ_a, ar kuru jāreizina visi instrumenta rādījumi, aprēķina pēc vienādojuma (1):

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

kur:

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

m = svaru jātnieciņa masa (g),

g = brīvās krišanas paātrinājums (981 cm s^{-2} jūras līmenī),

b = gredzena vidējais apkārtmērs (cm),

σ_a = tenzometra rādījums pēc jātnieciņa novietošanas uz gredzena (mN/m);

▼B

b) ar ūdeni: izmantojot tīru ūdeni, kura virsmas spraigums, piemēram, 23 °C temperatūrā, ir 72,3 mN/m. Šī procedūra ir vienkāršāka un ātrāka nekā kalibrēšana ar atsvariem, tomēr vienmēr pastāv iespēja, ka ūdens virsmas spraigums mainījies neliela virsmaktīvo vielu izraisīta piesārņojuma dēļ.

Kalibrēšanas koeficientu $\Phi_{b,}$ ar kuru jāreizina visi instrumenta rādījumi, aprēķina pēc vienādojuma (2):

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

kur:

σ_o = ūdens virsmas spraiguma vērtība pēc literatūras avotu datiem (mN/m),

σ_g = ūdens virsmas spraiguma izmērītā vērtība (mN/m), tajā pašā temperatūrā.

1.6.4.3. *Paraugu sagatavošana*

Analizējamās vielas izšķīdina ūdenī vajadzīgajā koncentrācijā, turklāt šķīdumā nedrīkst būt neizšķīdušas vielas daļiņas.

Šķīdumi jāuzglabā nemainīgā (± 0,5 °C) temperatūrā. Tā kā šķīduma virsmas spraigums mērtraukā mainās laika gaitā, jāveic vairāki mērījumi dažādā laikā un grafiski jāattēlo līkne, kas raksturo virsmas spraiguma izmaiņas laika ritumā. Ja izmaiņas vairs nenotiek, tad ir sasniegts līdzsvara stāvoklis.

Putekļi vai gāzveida vielu piemaisījumi ietekmē mērījumu rezultātus. Tāpēc mērījumi jāveic zem aizsargkupola.

1.6.5. **Testēšanas apstākļi**

Mērījumus veic aptuveni 20 °C temperatūrā, tās svārstības nedrīkst pārsniegt ± 0,5 °C.

1.6.6. **Testēšana**

Šķīdumu, kura virsmas spraigums jānosaka, pārnes rūpīgi izmazgātā mērtraukā, raugoties, lai tas neputotos, un pēc tam mērtrauku novieto uz mēraparāta galdiņa. Galdiņu ar mērtrauku paceļ, līdz gredzens iegrimst zem šķidruma, kura virsmas spraigums jānosaka. Tad plates virsu pakāpeniski un vienmērīgi nolaiž (ar ātrumu ap 0,5 cm/min), mēģinot atraut gredzenu no šķīduma virsmas, līdz sasniegts maksimālais spēks. Šķidruma slāni, kas saskaras ar gredzenu, nedrīkst atraut no gredzena. Pabeidzot mērījumu, gredzenu atkal iegremdē šķidrumā un atkārto mērījumus, kamēr iegūst nemainīgu virsmas spraiguma lielumu. Katram mērījumam jāatzīmē kopš šķīduma pārnešanas mērtraukā pagājušais laiks. Rezultātus nolasa brīdī, kad pielietots maksimālais spēks, mēģinot atraut gredzenu no šķidruma virsmas.

▼B

2. **DATI**

Virsmas spraiguma aprēķināšanai aparāta nolasījuma vērtību (mN/m) vispirms reizina ar kalibrēšanas koeficientu φ_a vai φ_b (atkarībā no izmantotās kalibrēšanas procedūras). Šādi iegūst tikai aptuvenu lielumu, kas ir jākoriģē.

Hārkinss [*Harkins*] un Džordans [*Jordan*] (4), veicot mērījumus ar gredzena metodi, empīriski noteica virsmas spraiguma korekcijas koeficientus, kas atkarīgi no gredzena izmēriem, šķidruma blīvuma un tā virsmas spraiguma.

Tā kā katram mērījumam noteikt korekcijas koeficientu pēc Hārkinsa un Džordana tabulām ir sarežģīti, ūdens šķīdumu virsmas spraiguma aprēķināšanai var izmantot vienkāršotu koriģēto virsmas spraiguma vērtību nolasīšanas procedūru tieši no tabulām. (Rādījumiem, kas nav atrodami tabulā, koriģēto vērtību iegūst interpolējot.)

Tabula

Virsmas spraiguma mērījumu korekcija

Tikai ūdens šķīdumiem, $\rho \cong 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (gredzena rādiusa vidējā vērtība),
r	= 0,185 mm (gredzena stieples rādiuss).

Eksperimentāli noteiktā vērtība (mN/m)	Koriģētā vērtība (mN/m)	
	Kalibrēšana ar atsvariem (skatīt 1.6.4.2.2. a))	Kalibrēšana ar ūdeni (skatīt 1.6.4.2.2. b))
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

Eksperimentāli noteiktā vērtība (mN/m)	Koriģētā vērtība (mN/m)	
	Kalibrēšana ar atsvariem (skatīt 1.6.4.2.2. a))	Kalibrēšana ar ūdeni (skatīt 1.6.4.2.2. b))
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	—

Šī tabula sastādīta pēc Hārkinsa un Džordana korekcijas metodes. Tā ir līdzīga standartā DIN 53914 dotajai tabulai ūdenim un ūdens šķīdumiem (blīvums p = 1 g/cm^3) un gataviem nopērkamiem gredzeniem ar gredzena rādiusa vidējo vērtību R = 9,55 mm un gredzena stieples rādiusu r = 0,185 mm. Šajā tabulā ir iekļauti koriģētās virsmas spraiguma vērtības mērījumi, ko veic pēc kalibrēšanas ar atsvariem vai pēc kalibrēšanas ar ūdeni.

Pastāv arī iespēja aprēķināt virsmas spraigumu bez iepriekšējas kalibrēšanas pēc šādas formulas:

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

kur:

F = spēks, kas iedarbojas uz šķidruma virsmas slāni tā atraušanās brīdī (dinamometra rādījums),

R = gredzena rādiuss,

f = korekcijas koeficients (1).

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— lietotā metode,

— izmantotais ūdens vai šķīdums,

— precīzs vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi),

— mērījumu rezultāti: virsmas spraigums (nolasījums), norādot gan atsevišķos nolasījumus, gan to vidējo aritmētisko vērtību, kā arī vidējā aritmētiskā koriģēto vērtību (ņemot vērā iekārtas koeficientu un korekcijas tabulu),

▼B

— šķīduma koncentrācija,

— temperatūra noteikšanas laikā,

— izmantotā šķīduma vecums; jo īpaši no šķīduma pagatavošanas līdz mērījumu veikšanai pagājušais laiks,

— virsmas spraiguma izmaiņas laikā pēc šķīduma pārnešanas mērtraukā,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, jo īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĒŠANA

Ņemot vērā, ka destilēta ūdens virsmas spraigums 20 °C temperatūrā ir 72,75 mN/m, vielas, kuru virsmas spraigums, kas noteikts pēc šīs metodes, ir mazāks par 60 mN/m, ir uzskatāmas par virsmaktīvām vielām.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, Vol. 52, p. 1751.

▼M4

A.6. ŠĶĪDĪBA ŪDENĪ

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas (ESAO) Testēšanas norādījumiem 105 (*TG*) (1995. gads). Šī testēšanas metode ir sākotnējo 1981. gadā pieņemto *TG 105* pārskatīta versija. Nav būtiskas atšķirības starp pašreizējo versiju un 1981. gada versiju. Galvenokārt ir mainīta forma. Pārskatīšanas pamatā bija ES testēšanas metode "Šķīdība ūdenī" ([1]).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

2. Vielas šķīdību ūdenī var būtiski ietekmēt piemaisījumi. Ar šo testēšanas metodi nosaka praktiski tīru, ūdenī stabilu un negaistošu vielu šķīdību ūdenī. Pirms noteic šķīdību ūdenī, ir lietderīgi iegūt provizorisku informāciju par testējamo vielu, piemēram, par struktūrformulu, tvaika spiedienu, disociācijas konstanti un hidrolīzi atkarībā no pH līmeņa.

3. Šis testēšanas metožu apraksts aptver divas metodes, proti, kolonnas eluēšanas metodi un kolbas metodi, kas attiecas uz šķīdību, kura ir attiecīgi mazāka un lielāka par 10^{-2} g/l. Ir aprakstīts arī vienkāršots provizorisks tests. Tajā var aptuveni noteikt, kādam jābūt galīgajā testā izmantotā parauga apjomam un cik daudz laika vajag, lai sasniegtu piesātinājumu.

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

4. Vielas šķīdība ūdenī ir vielas piesātinājuma masas koncentrācija ūdenī attiecīgajā temperatūrā.

5. Šķīdību ūdenī izsaka ar izšķīdušās vielas masu uz vienu šķīduma tilpuma vienību. SI mērvienība ir kg/m^3, bet var izmantot arī g/l.

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

6. Pētot testējamo vielu, nav vajadzības izmantot ķīmiskās standartvielas.

METOŽU APRAKSTS

Testēšanas apstākļi

7. Testu vēlams veikt 20 ± 0,5 °C temperatūrā. Izraudzītā temperatūra pastāvīgi jāuztur visās attiecīgajās iekārtas daļās.

Provizoriskais tests

8. Aptuveni 0,1 gramam parauga (cietas testējamās vielas ir jāsaberž pulverī) 10 ml mērcilindrā ar stikla aizbāzni pakāpeniski pieaugošā daudzumā pievieno ūdeni istabas temperatūrā. Pēc katras kāda ūdens daudzuma pievienošanas maisījumu 10 minūtes krata un vizuāli pārbauda, vai tajā vēl ir neizšķīdušas parauga daļiņas. Ja pēc 10 ml ūdens pievienošanas viss paraugs vai tā daļas nav izšķīdušas, noteikšanu atkārto 100 ml mērcilindrā. Aptuvenā šķīdība ir norādīta 1. tabulā zem pievienotā ūdens daudzuma, kurā notiek

▼M4

parauga pilnīga izšķīšana. Testējamām vielām ar zemu šķīdību pilnīgai izšķīšanai var būt vajadzīgs ilgs laiks un būtu jāļauj šķīst vismaz 24 stundas. Ja pēc 24 stundām viela joprojām nav izšķīdusi, būtu jāļauj šķīst ilgāku laiku (līdz 96 stundām) vai jāturpina atšķaidīšana, lai noskaidrotu, vai šķīdības noteikšanu vēlams veikt pēc kolonnas eluēšanas metodes vai kolbas metodes.

1. tabula

ml ūdens uz 0,1 g šķīdināmās vielas izšķīšanai	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Aptuvenā šķīdība g/l	> 1 000	1 000 līdz 200	200 līdz 100	100 līdz 50	50 līdz 10	10 līdz 1	< 1

Kolonnas eluēšanas metode

Metodes princips

9. Šīs metodes pamatā ir testējamās vielas eluēšana ar ūdeni no mikrokolonnas, kurā ir inerts nesējs, kas iepriekš ir bagātīgi pārklāts ar testējamo vielu (2). Šķīdību ūdenī izsaka kā eluāta masas koncentrāciju brīdī, kad šī koncentrācija kā laika funkcija ir sasniegusi plato.

Iekārta

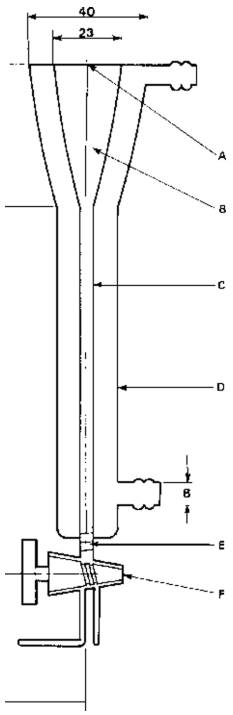
10. Iekārta sastāv no mikrokolonnas (1. attēls), ko uztur nemainīgā temperatūrā. Tā ir savienota vai nu ar recirkulācijas sūkni (2. attēls), vai ar spiediena izlīdzināšanas trauku (3. attēls). Mikrokolonnā ir inerts nesējs, ko vietā notur neliels stikla vates tampons, kurš vienlaikus aiztur neizšķīdušās daļiņas. Par nesēju var izmantot, piemēram, stikla lodītes, irdeno diatomītu vai citus inertus materiālus.

11. Turpmāk 1. attēlā parādītā mikrokolonna ir piemērota recirkulācijas sūkņa uzstādīšanai. Tai ir brīvais tilpums, kurā ietilpst pieci slāņa tilpumi (no kuriem testa sākumā atbrīvojas) un piecu paraugu tilpums (ko testa laikā atvelk analīzes veikšanai). Pastāv arī iespēja izmērus samazināt, ja testa laikā sistēmai var pievienot ūdeni, ar ko aizvieto sākotnējos piecus slāņa tilpumus, kuri tikuši izvadīti kopā ar piemaisījumiem. Ar inerta materiāla caurulīti kolonna ir pievienota recirkulācijas sūknim, ar kuru var piegādāt aptuveni 25 ml/h. Par recirkulācijas sūkni var izmantot, piemēram, peristaltisko sūkni vai membrānas sūkni. Jāizvairās no piesārņošanas ar caurulīšu materiālu un/vai attiecīgas adsorbcijas.

12. Turpmāk 3. attēlā ir parādīta shematiskā sistēma, kurā izmantots spiediena izlīdzināšanas trauks. Šajā sistēmā mikrokolonna ir aprīkota ar vienvirziena krānu. Spiediena izlīdzināšanas trauks ir pievienots ar pieslīpēta stikla savienojumu un inerta materiāla caurulīti. Spiediena izlīdzināšanas traukā ieteicams izmantot plūsmas ātrumu aptuveni 25 ml/h.

▼**M4**

1. attēls



Izmēri milimetros

A. Vieta slīpēta stikla savienojumam

B. Brīvais tilpums

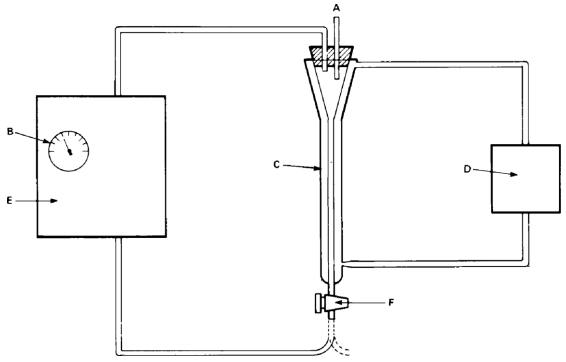
C. Iekšējais diametrs – 5

D. Ārējais diametrs – 19

E. Stikla vates tampons

F. Krāns

2. attēls



A. Gaisa caurule

B. Plūsmas mērītājs

C. Mikrokolonna

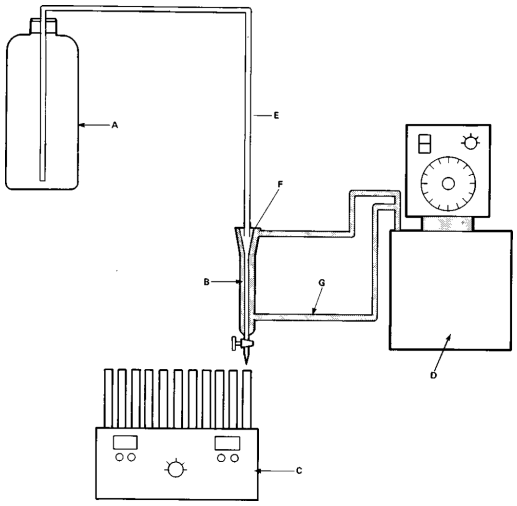
D. Termostatējams cirkulācijas sūknis

E. Recirkulācijas sūknis

F. Divkanālu ventilis paraugu ņemšanai

▼M4

3. attēls



A. Spiediena izlīdzināšanas trauks (piemēram, 2,5 litru ķīmisko vielu kolba)

B. Kolonna

C. Frakciju ievācējs

D. Termostats

E. Teflona caurule

F. Slīpēta stikla savienojums

G. Ūdenslīnija (starp termostatu un kolonnu, iekšējais diametrs ir aptuveni 8 mm)

13. Apaļkolbā (50 ml) ievieto aptuveni 600 mg nesējmateriāla. Vajadzīgo testējamās vielas daudzumu izšķīdina analītiski tīrā gaistošā šķīdinātājā, un attiecīgu šā šķīduma daudzumu pievieno nesējam. Šķīdinātāju pilnībā iztvaicē, piemēram, izmantojot rotācijas ietvaicētāju, tāpēc ka pretējā gadījumā eluēšanas laikā netiek panākta nesēja piesātināšanās ar ūdeni, jo notiek sadalīšanās uz virsmas. Sagatavoto nesējmateriālu divas stundas mērcē aptuveni 5 ml ūdens un suspensiju iepilda mikrokolonnā. Var arī sausu sagatavotu nesējmateriālu iebērt mikrokolonnā, kurā iepildīts ūdens, un divas stundas nostādināt.

14. Nesējmateriāla uzpildīšana var radīt problēmas, tādēļ iegūtie rezultāti var būt kļūdaini, piemēram, ja testējamā viela eļļveidīgi nogulsnējas. Šādas problēmas jāizskata, un rezultāti jāatspoguļo ziņojumā.

Procedūra ar recirkulācijas sūkni

15. Caur kolonnu sāk laist plūsmu. Tās ieteicamais ātrums ir apmēram 25 ml/h, kas atbilst aprakstītās kolonnas 10 slāņa tilpumiem stundā. Vismaz no pieciem pirmajiem slāņa tilpumiem atbrīvojas, lai atdalītu ūdenī šķīstošos piemaisījumus. Tad iedarbina sūkni, līdz iestājas līdzsvars, par ko liecina pieci secīgi paraugi, kuru koncentrācijas nejaušās atšķirības nepārsniedz ± 30 %. Šos paraugus ņem ar tādu laika intervālu, kurā izplūstošais daudzums atbilst vismaz 10 kolonnas slāņa tilpumiem. Atkarībā no izmantotās analītiskās metodes var būt vēlams izveidot koncentrācijas/laika līkni, pēc kuras varētu pārliecināties, ka ir sasniegts līdzsvars.

▼M4

Procedūra ar spiediena izlīdzināšanas trauku

16. Pēc secīgu eluāta frakciju ievākšanas tās analizē, izmantojot izraudzīto metodi. Šķīdības noteikšanai izmanto eluāta vidējās frakcijas, kurās vielas koncentrācija vismaz piecās secīgās frakcijās nemainīgi ir ± 30 %.

17. Ieteicamais eluents ir bidestilēts ūdens. Var izmantot arī dejonizētu ūdeni ar pretestību vairāk nekā 10 megaomi uz centimetru un kopējo organiskā oglekļa saturu zem 0,01 %.

18. Abās procedūrās otro sēriju veic ar plūsmas ātrumu, kas ir uz pusi mazāks par pirmās sērijas plūsmas ātrumu. Ja pēc abām sērijām iegūtie rezultāti sakrīt, uzskata, ka noteikšanas rezultāti ir apmierinoši. Ja ar mazāku plūsmas ātrumu noteiktā šķīdība ir lielāka, tad plūsmas ātrums divkārt jāsamazina tik ilgi, kamēr pēc divām secīgām sērijām iegūtie šķīdības rezultāti sakrīt.

19. Abos gadījumos jāpārbauda, vai frakcijas nesatur koloīdus, par ko liecina Tindala efekts. Šādu daļiņu klātbūtne padara rezultātus neizmantojamus, un noteikšana jāatkārto pēc kolonnas filtrācijas spējas uzlabošanas.

20. Jānosaka katra parauga pH līmenis, vēlams, izmantojot speciālas indikatorstrēmeles.

Kolbas metode

Metodes princips

21. Testējamo vielu (cietvielas ir jāsaberž pulverī) izšķīdina ūdenī temperatūrā, kas nedaudz pārsniedz temperatūru, kuru izmanto noteikšanai. Kad ir panākta piesātināšanās, maisījumu atdzesē un glabā tādā temperatūrā, kādā tiks veikta noteikšana. Vai arī, ja pienācīga paraugu ņemšanas programma liecina, ka ir sasniegts piesātinājuma līdzsvars, mērījumu (noteikšanas temperatūrā) var veikt nekavējoties. Pēc tam ar piemērotu analītisko metodi (3) nosaka testējamās vielas masas koncentrāciju ūdens šķīdumā, kas nedrīkst saturēt neizšķīdušas daļiņas.

Iekārta

22. Ir vajadzīgi šādi materiāli:

— parastie laboratorijas trauki un mēraparāti,

— ierīce, kas piemērota šķīdumu kustināšanai nemainīgā regulējamā temperatūrā,

— centrifūga (vēlams, termostatējama), ja vajadzīga emulsijām, un

— analītiskais aprīkojums.

Procedūra

23. Vispirms provizoriskā testā nosaka, kāds testējamās vielas daudzums nepieciešams vajadzīgā ūdens tilpuma piesātināšanai. Katrā no trijiem stikla traukiem ar stikla aizbāzni (piemēram, centrifūgas mēģenēs vai kolbās) iesver apmēram piecreiz lielāku minēto vielas daudzumu. Katrā traukā pievieno tik ūdens, cik vajadzīgs atkarībā no analītiskās metodes un šķīdības diapazona. Pēc tam traukus cieši noslēdz un saturu kustina 30 °C temperatūrā. Jāizmanto kratītājs vai maisītājs, kas var darboties nemainīgā temperatūrā, piemēram, jāmaisa ar magnētisko maisītāju termostatējamā ūdens vannā. Pēc vienas dienas vienu no traukiem 24 stundas testēšanas temperatūrā

▼M4

nostādina, to periodiski sakratot. Pēc tam trauka saturu centrifugē testēšanas temperatūrā un ar piemērotu analītisko metodi nosaka testējamās vielas koncentrāciju dzidrajā ūdens fāzē. Pēc attiecīgas divu un triju dienu nostādināšanas 30 °C temperatūrā tāpat rīkojas ar pārējām divām kolbām. Ja vismaz divos pēdējos traukos noteiktās koncentrācijas neatšķiras vairāk kā par 15 %, uzskata, ka tests ir izdevies. Ja ar pirmo, otro un trešo trauku iegūto rezultātu vērtībai ir tendence paaugstināties, tests pilnībā jāatkārto, izmantojot ilgāku nostādināšanas laiku.

24. Testu var veikt arī bez iepriekšējas inkubēšanas 30 °C temperatūrā. Lai noteiktu, cik ātri iestājas piesātinājuma līdzsvars, paraugus ņem līdz brīdim, kamēr maisīšanas ilgums vairs neietekmē noteikto koncentrāciju.

25. Jānosaka katra parauga pH līmenis, vēlams, izmantojot īpašas indikatorstrēmeles.

Analītiskā noteikšana

26. Ir ieteicams izmantot metodi, kas piemērota konkrētai vielai, jo pat neliels daudzums šķīstošu piemaisījumu šķīdības mērījumu rezultātos var radīt nopietnas kļūdas. Šādu metožu piemēri ir gāzhromatogrāfija vai šķidrumhromatogrāfija, titrēšana, fotometrija un voltametrija.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

Kolonnas eluēšanas metode

27. Katrā sērijā jāaprēķina vidējā vērtība un standartnovirze, izmantojot vismaz piecus secīgus piesātinājuma plato fāzē ņemtus paraugus. Vidējās vērtības, kas iegūtas divos testos ar dažādām plūsmām, nedrīkst atšķirties vairāk kā par 30 %.

Kolbas metode

28. Aprēķina vidējo vērtību no visu triju kolbu atsevišķajiem rezultātiem, kas nedrīkst atšķirties vairāk kā par 15 %.

Testēšanas pārskats

Kolonnas eluēšanas metode

29. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

— provizoriskā testa rezultāti,

— ķīmiskā identitāte un piemaisījumi (iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta),

— katram paraugam noteiktās koncentrācijas, plūsmas ātrumi un pH,

— vidējās vērtības un standartnovirzes, kas katrā sērijā noteiktas vismaz pieciem paraugiem, kuri ņemti piesātinājuma plato fāzē,

— vismaz divu secīgu sēriju vidējā vērtība,

— ūdens temperatūra piesātināšanas procesa laikā,

— izmantotā analīzes metode,

— nesējmateriāls,

— nesējmateriāla uzpildīšana,

— izmantotais šķīdinātājs,

— liecības par vielas ķīmisko nestabilitāti testa laikā,

— visa informācija, kas vajadzīga rezultātu interpretēšanai, it sevišķi par piemaisījumiem un testējamās vielas agregātstāvokli.

▼**M4**

Kolbas metode

30. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

— provizoriskā testa rezultāti,

— ķīmiskā identitāte un piemaisījumi (iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta),

— atsevišķo analītisko noteikšanu rezultāti un vidējās vērtības gadījumos, kad vienai kolbai noteikta vairāk nekā viena vērtība,

— katra parauga pH,

— no vairākām kolbām iegūto sakrītošo rezultātu vidējā vērtība,

— testēšanas temperatūra,

— analītiskā metode,

— liecības par vielas ķīmisko nestabilitāti testa laikā,

— visa informācija, kas vajadzīga rezultātu interpretēšanai, it sevišķi par piemaisījumiem un testējamās vielas agregātstāvokli.

LITERATŪRA

(1) Komisijas 1992. gada 31. jūlija Direktīva 92/69/EEK, ar ko septiņpadsmito reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu (OV L 383, 29.12.1992., 54. lpp.).

(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. SADALĪŠANĀS KOEFICIENTS

1. METODE

Aprakstītās "kolbu kratīšanas" metodes pamatā ir ESAO Testēšanas norādījumi (1).

1.1. IEVADS

Pirms noteikt sadalīšanās koeficientu, ir lietderīgi iegūt sākotnēju informāciju par vielas struktūru, disociācijas konstanti, šķīdību ūdenī, hidrolīzi, šķīdību n-oktanolā un virsmas spraigumu.

To nosaka tikai jonizējamu vielu nejonizētajām formām (brīvām skābēm vai bāzēm), kas rodas, izmantojot piemērotu buferšķīdumu ar pH, kas ir vismaz vienu pH vienību zem (brīvām skābēm) vai vienu pH vienību virs (brīvām bāzēm) tās pK.

Šajā noteikšanas metodē ietilpst divas atsevišķas procedūras: "kolbu kratīšanas" metode un augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija (HPLC). Pirmo izmanto gadījumos, kad log P_{ow} vērtība (skatīt definīcijas turpmāk) ir no –2 līdz 4, bet otro – ja tā ir no 0 līdz 6. Pirms veikt eksperimentālu noteikšanu pēc kādas no minētajām metodēm, vispirms jāveic sadalīšanās koeficienta orientējoši aprēķini.

"Kolbu kratīšanas" metode izmantojama tikai praktiski tīrām vielām, kuras šķīst ūdenī un n-oktanolā. Tā nav izmantojama virsmaktīvām vielām (kurām norāda aprēķināto vērtību vai novērtējumu pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī).

Augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijas metode nav izmantojama stiprām skābēm un bāzēm, metālu kompleksajiem savienojumiem, virsmaktīvajām vielām un vielām, kuras reaģē ar eluentu. Šīm vielām uzdod sadalīšanās koeficenta aprēķināto vērtību vai pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī novērtēto vērtību.

Augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijas metode ir mazāk jutīga pret nosakāmās vielas piemaisījumiem nekā "kolbu kratīšanas" metode. Tomēr dažos gadījumos piemaisījumi apgrūtina rezultātu interpretāciju, jo ne vienmēr ir iespējama visu signālu identificēšana. Maisījumiem, kuri dod neidentificētu signālu, jānorāda log P augšējās un apakšējās robežas.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Sadalīšanās koeficientu (P) definē kā izšķīdušās vielas līdzsvara koncentrāciju attiecību (q), iestājoties līdzsvaram divfāžu sistēmā, ko veido divi šķīdinātāji, kam ir savstarpēji ierobežota šķīdība. n-oktanols/ūdens sistēmā:

$$P_{ow} = \frac{c_n - \text{oktanols}}{c_{\text{ūdens}}}$$

Tātad sadalīšanās koeficients (P) ir divu koncentrāciju attiecība, kas parasti izteikta decimāllogaritma veidā (log P).

▼B

1.3. STANDARTVIELAS

"Kolbu kratīšanas" metode

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūto rezultātu salīdzināšanai.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Lai saistītu savienojuma hromatogrāfijas datus ar tā P vērtību, pēc vismaz 6 punktiem jāizveido kalibrēšanas grafiks par log P vērtību atkarībā no hromatogrāfijas datiem. Piemērotas standartvielas izraugās pats metodes lietotājs. Visos iespējamajos gadījumos vismaz vienas standartvielas P_{ow} ir jābūt zemākai par šā rādītāja vērtību nosakāmajai vielai, bet otras – par to augstākai. Ja log P ir mazāks par 4, kalibrēšanai izmanto pēc "kolbu kratīšanas" metodes iegūtos datus. Ja log P ir lielāks par 4, kalibrēšanai var izmantot apstiprinātus literatūras datus, ja tie atbilst aprēķinātajām vērtībām. Precizitātes paaugstināšanai ir ieteicams izmantot standartvielas, kuru struktūra ir līdzīga nosakāmās vielas struktūrai.

Par daudzām ķīmisko vielu grupām ir publicēti (2) (3) plaši log P_{ow} saraksti. Ja nav datu par sadalīšanās koeficientu vērtībām savienojumiem ar līdzīgu struktūru, var izmantot vispārīgāku kalibrēšanu pēc citām standartvielām.

Ieteicamo standartvielu saraksts un to P_{ow} vērtības dotas 2. papildinājumā.

1.4. METODES PRINCIPS

1.4.1. **"Kolbu kratīšanas" metode**

Lai noteiktu sadalīšanās koeficientu, ir jāiestājas līdzsvaram starp visiem mijiedarbībā esošiem sistēmas komponentiem un jānosaka abās fāzēs izšķīdušo vielu koncentrācija. Attiecīgās literatūras norādes liecina par to, ka šo problēmu var atrisināt ar dažādiem tehniskiem paņēmieniem, proti, atdalot abas fāzes pēc to rūpīgas sajaukšanas, lai noteiktu analizējamās vielas koncentrāciju, iestājoties līdzsvaram.

1.4.2. **Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode**

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai izmanto kolonnas ar gatavas nopērkamas cietās fāzes pildījumu, kas satur garas ogļūdeņražu virknes (piemēram, C_8, C_{18}), kas ķīmiski saistītas ar silīcija dioksīdu. Šādā kolonnā ievadītās vielas tajā pārvietojas ar dažādu ātrumu atšķirīgas sadalīšanās dēļ starp kustīgo fāzi un ogļūdeņražu nekustīgo fāzi. Ķīmisko vielu maisījumi eluējas to hidrofobitātes secībā, vispirms eluējas ūdenī šķīstošās vielas, bet pēc tam – eļļās šķīstošās vielas proporcionāli to sadalīšanās koeficientam ogļūdeņražos/ūdenī. Tas rada iespējas noteikt aiztures laika sakarību šādā (apgriezto fāžu) kolonnā ar sadalīšanās koeficientu n-oktanolā/ūdenī. Sadalīšanās koeficientu nosaka pēc ietilpības koeficienta k, kuru aprēķina šādi:

▼B

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

kur t_R = ir nosakāmās vielas aiztures laiks un t_o = ir vidējais laiks, kādā šķīdinātāja molekula iziet cauri kolonnai (tukšais laiks).

Kvantitatīva noteikšana nav vajadzīga, un ir jānosaka tikai eluēšanās laiki.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.5.1. **Atkārtojamība**

"Kolbu kratīšanas" metode

Lai nodrošinātu precīzu sadalīšanās koeficienta noteikšanu, jāveic divi mērījumi trīs dažādos režīmos, turklāt var mainīt pārbaudāmās vielas daudzumu un šķīdinātāju tilpumu attiecību. Eksperimentāli noteiktā sadalīšanās koeficienta decimāllogaritmu atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 0,3 log vienības.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Lai paaugstinātu mērījumu rezultātu ticamību, noteikšana jāveic divos atkārtojumos. Pēc atsevišķiem mērījumiem noteikto log P vērtību atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 0,1 log vienības.

1.5.2. **Jutība**

"Kolbu kratīšanas" metode

Metodes mērījumu diapazons ir atkarīgs no analītiskās metodes noteikšanas robežas. Tai jādod iespējas noteikt log P_{ow} vērtības robežās no –2 līdz 4 (atsevišķos gadījumos šo intervālu var paplašināt līdz log P_{ow} vērtībām līdz pat 5), ja izšķīdušās vielas koncentrācija kādā no fāzēm nepārsniedz 0,01 mol/l.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode

Pēc augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodes var noteikt sadalīšanās koeficientu log P_{ow} vērtības intervālā no 0 līdz 6.

Parasti vielas sadalīšanās koeficientu var noteikt ar precizitāti ± 1 log vienība salīdzinājumā ar "kolbu kratīšanas" metodi. Korelācijas norādītas literatūras avotos (4) (5) (6) (7) (8). Parasti augstāku precizitāti panāk, ja korelācijas grafikiem izmanto līdzīgas struktūras savienojumus (9).

▼B

1.5.3. **Specifiskums**

"Kolbu kratīšanas" metode

Nernsta sadalījuma likums attiecas tikai uz atšķaidītiem šķīdumiem, kuru temperatūra, spiediens un pH līmenis ir nemainīgi. To var droši piemērot tīrai vielai, kas sadalījusies starp diviem tīriem šķīdinātājiem. Ja vienā vai abās fāzēs vienlaicīgi atrodas vairākas izšķīdušas vielas, tas var ietekmēt iegūtos rezultātus.

Šķīdumā esošo molekulu disociācijas vai asociācijas dēļ novēro atkāpes no Nernsta sadalījuma likuma. Par šādām atkāpēm liecina tas, ka sadalījuma koeficients kļūst atkarīgs no šķīduma koncentrācijas.

Tā kā vienlaikus iestājas vairāki sadalījuma līdzsvari, šī metode bez attiecīgas korekcijas nav izmantojama jonizējamiem savienojumiem. Šajā gadījumā var mēģināt ūdens vietā izmantot buferšķīdumus; buferšķīduma pH vismaz par 1 pH vienību jāatšķiras no vielas pK_a, un jāņem vērā šā pH ietekme uz vidi.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sadalīšanās koeficienta orientējoša noteikšana**

Sadalīšanās koeficientu vēlams noteikt pēc aprēķinu metodes (skatīt 1. papildinājumu) vai attiecīgos gadījumos pēc testējamās vielas šķīdības tīros šķīdinātājos (10).

1.6.2. **"Kolbu kratīšanas" metode**

1.6.2.1. *Sagatavošana*

n-oktanols: sadalīšanās koeficienta noteikšanai izmanto ļoti tīru analītisko reaģentu.

Ūdens: izmanto stikla vai kvarca destilācijas aparātā iegūtu destilētu vai bidestilētu ūdeni. Piemērotos gadījumos jonizējamu vielu sadalīšanās koeficienta noteikšanai ūdens vietā jāizmanto buferšķīdumi.

Piezīme

Nedrīkst izmantot ūdeni, kas tieši iegūts, izmantojot jonu apmaiņas sveķus.

1.6.2.1.1. Šķīdinātāju iepriekšēja piesātināšana

Pirms noteikt sadalīšanās koeficientu, šķīdinātāju sistēmas fāzes tiek savstarpēji piesātinātas, kratot noteikšanas temperatūrā. Šim nolūkam iesaka mehāniskajā kratītājā uz 24 stundām ievietot divas lielas pudeles ar analītiski ļoti tīru n-oktanolu vai ūdeni, kam pietiekamā daudzumā pievienots arī otrs šķīdinātājs, un pēc tam nostādina, lai fāzes sadalītos un iestātos piesātinājums.

▼B

1.6.2.1.2. Sagatavošanās noteikšanai

Divfāžu sistēma pēc tilpuma piepilda gandrīz visu izmēģinājuma trauku. Šādi var novērst vielas iztvaikošanas zudumus. Izmantojamo vielu tilpumu attiecību un daudzumu izvēlas, pamatojoties uz:

— sadalīšanās koeficienta orientējošu novērtējumu (skatīt iepriekš),

— nosakāmās vielas minimālo daudzumu, kas nepieciešams analīzes veikšanai, un

— maksimālās koncentrācijas ierobežojumiem abām fāzēm, kas ir 0,01 mols/l.

Jāveic trīs izmēģinājumi. Pirmajā izmanto aprēķināto n-oktanola un ūdens attiecību; otrajā šo attiecību samazina uz pusi; trešajā to divas reizes palielina (piemēram, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Pārbaudāmā viela

Pagatavo vielas standartšķīdumu n-oktanolā, kas piesātināts ar ūdeni. Standartšķīduma faktisko masas koncentrāciju nosaka precīzi, pirms to izmanto sadalīšanās koeficienta noteikšanai. Šo šķīdumu glabā apstākļos, kuros tiek nodrošināta to stabilitāte.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Pārbaudes laikā jānodrošina nemainīga (± 1 °C) temperatūra no 20 līdz 25 °C diapazonā.

1.6.2.3. *Mērījumu procedūra*

1.6.2.3.1. Sadalījuma līdzsvara iestāšanās

Izmantošanai katrā noteikšanas režīmā sagatavo divus izmēģinājuma traukus, kas satur abus šķīdinātājus precīzi nomērītā daudzumā, kā arī standartšķīdumu vajadzīgā daudzumā.

n-oktanola fāzes mēra pēc tilpuma. Abi izmēģinājuma trauki jāievieto kratītājā vai tie jākrata ar roku. Izmantojot centrifūgas mēģenes, tās ieteicams ātri griezt par 180° ap šķērsasi tā, lai tajās esošais gaiss paceltos cauri abām fāzēm. Pieredze liecina, ka sadalīšanās līdzsvars iestājas pēc apmēram 50 šādiem apgriezieniem. Precizitātes labad ieteicams izdarīt 100 šādus apgriezienus piecu minūšu laikā.

1.6.2.3.2. Fāžu atdalīšana

Lai atdalītu fāzes, maisījums jācentrifugē. Šim nolūkam izmanto laboratorijas centrifūgu istabas temperatūrā vai, ja centrifūgai nav termostata, centrifūgas stobriņi pirms analīzes vismaz vienu stundu jāuzglabā noteikšanas temperatūrā, lai atkal iestātos līdzsvars.

▼B

1.6.2.4. *Analīze*

Lai iegūtu sadalījuma koeficientu, ir jānosaka pārbaudāmās vielas koncentrācija abās fāzēs. To var izdarīt, paņemot no katras mēģenes visos pārbaudes režīmos alikvoto daļu no abām fāzēm un analizējot tās pēc izvēlētās metodes. Aprēķina vielas kopējo daudzumu abās fāzēs un salīdzina to ar sākotnēji ievadīto vielas daudzumu.

Ūdens fāzes paraugi jāņem tā, lai samazinātu iespējas paraugā iekļūt n-oktanolam: ūdens fāzes paraugu ņemšanai var izmantot stikla šļirci ar maināmu adatu. Sākumā šļircei jābūt daļēji piepildītai ar gaisu. Gaisu lēni izspiež, adatu vadot caur oktanola slāni. Šļircē iesūc vajadzīgo ūdens fāzes daudzumu. Šļirci ātri izvelk no šķīduma un noņem adatu. Šļirces saturu var izmantot par ūdens fāzes paraugu. Vielas koncentrāciju abās atdalītajās fāzēs vēlams noteikt ar attiecīgajai vielai piemērotu metodi. Iespējamās analīžu metodes ir:

— fotometriskās metodes,

— gāzu hromatogrāfija,

— augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija.

1.6.3. **Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metode**

1.6.3.1. *Sagatavošana*

Aprīkojums

Ar sūkni, kas nerada pulsācijas, aprīkots šķidruma hromatogrāfs ar piemērotu detektēšanas ierīci. Ieteicams izmantot inžekcijas vārstu ar inžektora cilpu. Polāru grupu klātbūtne nekustīgajā fāzē var nopietni pasliktināt kolonnas darbības efektivitāti. Tāpēc nekustīgajā fāzē jābūt iespējami mazam polāro grupu saturam (11). Var izmantot gatavas nopērkamas kolonnas ar pildījumu vai mikrodaļiņu apgrieztās fāzes pildījumu. Starp inžekcijas sistēmu un analītisko kolonnu var uzstādīt aizsargkolonnu.

Kustīgā fāze

Eluentu pirms lietošanas degazē, un tā pagatavošanai izmanto HPLC tīrības pakāpes metanolu un HPLC tīrības pakāpes ūdeni. Izmanto izokrātisko eluēšanu. Jāizmanto metanola/ūdens maisījumi ar minimālo ūdens saturu 25 %. Parasti ar metanola-ūdens maisījumu 3:1 (v/v) stundas laikā ar plūsmas ātrumu 1 ml/min eluējas savienojumi, kuru log P ir 6. Savienojumiem ar augstu log P vērtību (un arī standartvielām) eluēšanas laiks var būt jāsamazina, samazinot kustīgās fāzes polaritāti vai kolonnas garumu.

Vielām ar ļoti zemu šķīdību n-oktanolā pēc augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodes nosaka stipri pazeminātas log P_{ow} vērtības; šādu vielu signāli dažkārt ir kopā ar šķīdinātāja fronti. Iespējams, tas ir tādēļ, ka sadalīšanās process notiek pārāk lēni, lai sasniegtu līdzsvaru laikā, kādā parasti augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijā notiek sadalīšanās pa fāzēm. Šādos gadījumos ticamas vērtības noteikšanai var noderēt plūsmas ātruma un/vai metanola/ūdens attiecības samazināšana.

▼B

Lai nosakāmo vielu un standartvielu varētu detektēt, tām jābūt pietiekamā koncentrācijā šķīstošām kustīgajā fāzē. Piedevas metanola-ūdens maisījumam izmanto tikai izņēmuma gadījumos, jo piedevu ietekmē mainās kolonnas īpašības. Hromatogrammām ar piedevām obligāti jāizmanto tāda paša veida atsevišķa kolonna. Ja metanola-ūdens maisījumu nevar izmantot, var lietot citus maisījumus, piemēram, etanola ūdens vai acetonitrila-ūdens maisījumu.

Jonizējamiem savienojumiem ļoti svarīgs eluenta pH. Tam jābūt kolonnas pH darbības intervālā, kas parasti ir no 2 līdz 8. Ieteicams izmantot buferšķīdumus. Jāraugās, lai nenotiktu sāļu nogulsnēšanās un kolonnas bojāšanās, kuru izraisa daži organiskās fāzes/buferu maisījumi. Nav ieteicams augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai izmantot nekustīgās fāzes uz silīcija dioksīda bāzes ar pH virs 8, jo bāziska kustīgā fāze var izraisīt strauju kolonnas efektivitātes pasliktināšanos.

Šķīdumi

Jāizmanto iespējami tīras standartvielas. Kalibrēšanai izmantojamās vielas, ja iespējams, jāšķīdina kustīgajā fāzē.

Pārbaudes apstākļi

Mērījumu laikā temperatūra nedrīkst mainīties vairāk par ± 2 K.

1.6.3.2. **Mērījumi**

Tukšā laika t_0 aprēķināšana

Tukšo laiku t_0 var noteikt, izmantojot homologu sērijas (piemēram, n-alkilmetilketonus) vai organiskos savienojumus, kas netiek aizturēti (piemēram, tiourīnviela vai formamīds). Tukšā laika t_0 aprēķināšanai, izmantojot homologus, injicē vismaz septiņus homologus un nosaka to aiztures laikus. Neapstrādātus aiztures laikus $t_{r\,(nc+1)}$ izsaka kā $t_{r\,(nc)}$ funkciju, izmantojot regresijas vienādojuma brīvo locekli a un virziena koeficientu b:

$$t_{r\,(n\,c+1)} = a + b\ t_{r\,(n\,c)}$$

(n_c = ir oglekļa atomu skaits). Tukšo laiku t_0 tad aprēķina šādi:

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

▼B

Kalibrēšanas līkne

Nākamais posms ir attiecīgajām standartvielām noteikt log k korelāciju ar log P vērtībām. Praktiski vienlaicīgi injicē un nosaka aiztures laikus 5 līdz 10 tādām standartvielām, kuru log P ir sagaidāmajā intervālā, vēlams izmantot reģistrējošu integratoru, kas savienots ar detektēšanas sistēmu. Aprēķina ietilpības koeficientu k attiecīgos logaritmus, kurus izsaka kā log P funkciju, kas noteikta pēc "kolbu kratīšanas" metodes. Kalibrēšanu veic regulāri vismaz reizi dienā tā, lai varētu ņemt vērā iespējamās kolonnas efektivitātes izmaiņas.

Testējamās vielas ietilpības koeficienta noteikšana

Testējamo vielu injicē iespējami mazā kustīgās fāzes daudzumā. Nosaka aiztures laiku (divos atkārtojumos), pēc kura aprēķina ietilpības koeficientu k. Pēc standartvielu korelācijas grafika interpolē nosakāmās vielas sadalīšanās koeficientu. Ļoti zemas un ļoti augstas sadalīšanās koeficienta vērtības ir jānosaka ekstrapolējot. Šādos gadījumos īpaša vērība jāveltī regresijas līnijas ticamības robežām.

2. **DATI**

"Kolbu kratīšanas" metode

Noteikto P vērtību ticamību var pārbaudīt, salīdzinot divu mērījumu vidējo vērtību ar kopējo vidējo vērtību.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— gadījumos, kad aprakstītās metodes nav izmantojamas (piemēram, virsmaktīvām vielām), norāda aprēķināto vērtību vai novērtējumu pēc šķīdības atsevišķi n-oktanolā un ūdenī,

— visa informācija un piezīmes, kas vajadzīgas uzdoto rezultātu interpretēšanai, īpaši dati par piemaisījumiem un vielas agregātstāvokli.

"Kolbu kratīšanas" metodei:

— orientējošas noteikšanas rezultāti, ja tā veikta,

— temperatūra noteikšanas laikā,

— dati par analītisko metodi, kas izmantota koncentrācijas noteikšanai,

— centrifugēšanas ilgums un ātrums, ja to izmanto,

▼B

— noteiktās koncentrācijas abās fāzēs katrai noteikšanai (tas nozīmē, ka pavisam jānorāda 12 koncentrācijas),

— nosakāmās vielas masa, katras fāzes tilpums katrā izmēģinājuma traukā un pārbaudāmās vielas kopējais aprēķinātais daudzums katrā fāzē pēc līdzsvara iestāšanās,

— pārskatā jāiekļauj aprēķinātās sadalīšanās koeficienta (P) vērtības katrā pārbaudes režīmā, kā arī mērījumu rezultātu vidējās vērtības. Ja var secināt, ka sadalīšanās koeficients ir atkarīgs no koncentrācijas, tas jānorāda protokolā,

— jānorāda atsevišķo P vērtību standartnovirzes no vidējās vērtības,

— jānorāda arī visu mērījumu vidējās P vērtības decimāllogaritms,

— aprēķinātā teorētiskā P_{ow} vērtība, ja tāda ir noteikta vai ja mērījumu rezultāts ir $> 10^4$,

— izmantotā ūdens un ūdens fāzes pH līmenis eksperimenta laikā,

— ja izmanto buferšķīdumus, jāpamato, kāpēc tie izmantoti ūdens vietā, buferšķīdumu sastāvs, koncentrācija un pH, ūdens fāzes pH noteikšanas sākumā un beigās.

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas metodei:

— orientējošas noteikšanas rezultāti, ja tā veikta,

— nosakāmā viela, standartvielas, to tīrība,

— noteikšanas temperatūru intervāls,

— pH, kādā veikta noteikšana,

— analītiskās kolonnas un aizsargkolonnas, kustīgās fāzes un detektēšanas līdzekļu apraksts,

— kalibrēšanai izmantoto standartvielu aiztures laiku un literatūrā norādītās log P vērtības,

— regresijas (log k atkarībā no log P) dati,

— testējamās vielas vidējais aiztures laiks un interpolētā log P vērtība,

— iekārtas un tās darbības režīma apraksts,

— eluēšanās raksturojums,

— kolonnā ievadītie testējamās vielas un standartvielu daudzumi,

— tukšais laiks un tā noteikšanas paņēmiens.

▼B

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 683.

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

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, Vol. 10, p. 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, Vol. 247, p. 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, Vol. 7, p. 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, Vol. 15, p. 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, p. 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, Vol. 71, p. 525.

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

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

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, Vol. 12, p. 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, Vol. 71, p. 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, Vol. 16, p. 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, Vol. 8, p. 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, Vol. 10, p. 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, Base1, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, Vol. 19, p. 615.

▼B

1. Papildinājums

Aprēķinu/novērtēšanas metodes

IEVADS

Vispārīgs aprēķinu metožu apskats, dati un piemēri ir atrodami rokasgrāmatā "*Handbook of Chemical Property Estimation Methods*" (a).

P_{ow} aprēķinātās vērtības var izmantot:

— piemērotāko eksperimentālo metožu izvēlei ("kolbu kratīšanas" metode: log P_{ow}: –2 līdz 4, HPLC metode: log P_{ow}: 0 līdz 6),

— piemērotāko noteikšanas apstākļu izvēlei (piemēram, lai izraudzītos standartvielas HPLC metodei, n-oktanola/ūdens tilpuma attiecības noteikšanai "kolbu kratīšanas" metodei),

— laboratorijas iekšējai pārbaudei iespējamo eksperimentālo kļūdu noteikšanai,

— gadījumos, kad tehnisku iemeslu dēļ P_{ow} nav iespējams noteikt eksperimentāli, tā novērtētās vērtības noteikšanai.

NOVĒRTĒJUMA METODE

Sadalīšanās koeficienta orientējoša novērtēšana

Sadalīšanās koeficienta vērtību var novērtēt pēc testējamās vielas šķīdības tīros šķīdinātājos. Šajā gadījumā aptuvenais P novērtējums = piesātinājuma koncentrācija n-oktanolā (C)/piesātinājuma koncentrācija ūdenī (C):

$$P_{\text{novērtētais}} = \frac{\text{piesātinājuma koncentrācija } c_{n-\text{oktanolā}}}{\text{piesātinājuma koncentrācija } c_{\text{ūdenī}}}$$

APRĒĶINA METODES

Aprēķinu metožu būtība

Visu aprēķina metožu pamatā ir molekulas formāla sadalīšana struktūrelementos ar zināmu log P_{ow}. Visas molekulas log P_{ow} aprēķina kā attiecīgo struktūrelementu summu, kurai pieskaita iekšmolekulārās mijiedarbības korekciju.

Struktūrelementu fragmentu konstantes un korekcijas atrodamas (b), (c), (d), (e). Daļa no tiem tiek regulāri atjaunināti un papildināti (b).

Kvalitātes kritēriji

Parasti aprēķinu metodes ticamība pazeminās, paaugstinoties testējamā savienojuma struktūras sarežģītībai. Vienkāršām molekulām ar nelielu molekulmasu un vienu vai divām funkcionālajām grupām pēc dažādām sadalīšanās metodēm noteiktās log P_{ow} vērtības var atšķirties no eksperimentāli noteiktajām par 0,1 līdz 0,3 vienībām. Sarežģītākas struktūras savienojumiem šīs atšķirības var būt lielākas. Tās ir atkarīgas no struktūrfragmentu konstanšu pieejamības un to ticamības, kā arī iespējām ņemt vērā iekšmolekulāro mijiedarbību (piemēram, ūdeņraža saites) un korekciju pareizu ieviešanu (šī problēma ir mazāka, izmantojot datorprogrammu CLOGP-3) (b). Savienojumiem, kas jonizējas, svarīgi ir pareizi ņemt vērā lādiņu vai jonizācijas pakāpi.

▼B

Aprēķināšanas procedūras

Henša [Hansch] π-metode

Sākotnēji hidrofobā aizvietotāja konstanti π_x ieviesa *Fujita* u. c.π_x definē šādi:

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

kur P_{ow} (PhX) ir aromātiskā atvasinājuma sadalīšanās koeficients un P_{ow} (PhH) izejas savienojuma sadalīšanās koeficients

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

Saskaņā ar definīciju π-metode galvenokārt izmantojama aizvietotajiem aromātiskajiem savienojumiem. Ļoti lielam skaitam aizvietotāju π vērības apkopotas tabulu veidā (b) (c) (d). Tās izmantojamas aromātisko savienojumu vai struktūrelementu log P_{ow} aprēķināšanai.

Rekera [Rekker] metode

Pēc Rekera (g) log P_{ow} vērtību aprēķina šādi:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{korekcijas locekļi})$$

kur f_i ir dažādu molekulas fragmentu konstantes un a_i ir to parādīšanās biežums pētamajā molekulā. Korekcijas locekļus var izteikt vienas konstantes C_m (t. s. "maģiskās konstantes") veselu skaitļu daudzkārtņu veidā. Struktūras fragmentu konstantes f_i un C_m noteiktas pēc 1 054 eksperimentāli iegūtām P_{ow} vērtībām (825 savienojumi), izmantojot daudzfaktoru regresijas analīzi (c), (h). Korekcijas locekļus nosaka pēc literatūrā (e), (h), (i) aprakstītajiem noteikumiem.

Henša-Leo [Hansch-Leo]metode

Pēc Henša un Leo (c) log P_{ow} vērtību aprēķina šādi:

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

kur f_i ir dažādu molekulas fragmentu konstantes, F_i ir korekcijas locekļi, bet a_i b_j – to parādīšanās biežums. Ar mēģinājumu un kļūdu metodi, izmantojot eksperimentāli noteiktās P_{ow} vērtības, sastādīts atomu un grupu fragmentu vērtību korekcijas locekļu F_j (t. s. "koeficientu") saraksts. Korekcijas locekļi iedalīti vairākās klasēs (a) (c). Ņemt vērā visus noteikumus un korekcijas locekļus ir diezgan sarežģīti, un tas prasa daudz laika. Šim nolūkam ir izstrādāta īpaša programmatūra (b).

Kombinētā metode

Sarežģītām molekulām log P_{ow} aprēķinus var ievērojami uzlabot, ja molekulu dala lielākos struktūras fragmentos, kuriem noteiktas ticamas log P_{ow} vērtības, pēc tabulām (b) (c) vai pašu veiktos eksperimentos. Šādus fragmentus (piemēram, heterocikli, antrahinons, azobenzols) pēc tam var apvienot ar Henša π vērtībām vai Rekera vai Leo fragmentu konstantēm.

Piezīmes

i) Aprēķinu metodes var izmantot tikai daļēji vai pilnīgi jonizētiem savienojumiem, kad ir iespējams ņemt vērā vajadzīgos korekcijas koeficientus.

▼B

ii) Ja iespējams, ka savienojumā ir iekšmolekulāras ūdeņraža saites, jāpievieno attiecīgie korekcijas locekļi (apmēram + 0,6 līdz + 1,0 log P_{ow} vienības) (a). Norādes par šādu saišu esamību var iegūt pēc molekulu struktūras telpiskajiem modeļiem vai spektroskopijas datiem.

iii) Ja savienojumam iespējamas vairākas tautomērās formas, aprēķinus izdara pēc iespējamākās no tām.

iv) Uzmanīgi jāseko struktūrfragmentu konstanšu tabulu pārskatīšanai.

Pārskats

Izmantojot aprēķinu/novērtēšanas metodes, testēšanas pārskatā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju:

— vielas apraksts (maisījums, piemaisījumi u. c.),

— norādes uz iespējamajām iekšmolekulārajām saitēm, disociāciju, lādiņu un dažādiem citiem neraksturīgiem efektiem (piemēram, tautomēriju),

— aprēķinu metodes apraksts,

— datubāzes identifikācija vai izmantotie dati,

— struktūrfragmentu izraudzīšanās īpatnības,

— aprēķinu sīka dokumentēšana.

LITERATŪRA

(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, p. 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, Vol. 14, p. 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, Vol. 86, p. 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, p. 1459.

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

▼B

2. Papildinājums

Augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijai ieteicamās standartvielas

Nr.	Standartviela	log P_{ow}	pKa
1.	2-Butanons	0,3	
2.	4-Acetilpiridīns	0,5	
3.	Anilīns	0,9	
4.	Acetanilīds	1,0	
5.	Benzilspirts	1,1	
6.	p-Metoksifenols	1,3	pKa = 10,26
7.	Fenoksietiķskābe	1,4	pKa = 3,12
8.	Fenols	1,5	pKa = 9,92
9.	2,4-Dinitrofenols	1,5	pKa = 3,96
10.	Benzonitrils	1,6	
11.	Fenilacetonitrils	1,6	
12.	4-Metilbenzilspirts	1,6	
13.	Acetofenons	1,7	
14.	2-Nitrofenols	1,8	pKa = 7,17
15.	3-Nitrobenzoskābe	1,8	pKa = 3,47
16.	4-Hloranilīns	1,8	pKa = 4,15
17.	Nitrobenzols	1,9	
18.	Kanēļspirts	1,9	
19.	Benzoskābe	1,9	pKa = 4,19
20.	p-Krezols	1,9	pKa = 10,17
21.	Kanēļskābe	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22.	Anizols	2,1	
23.	Metilbenzoāts	2,1	
24.	Benzols	2,1	
25.	3-Metilbenzoskābe	2,4	pKa = 4,27
26.	4-Hlorfenols	2,4	pKa = 9,1
27.	Trihloretilēns	2,4	
28.	Atrazīns	2,6	
29.	Etilbenzoāts	2,6	
30.	2,6-Dihlorbenzonitrils	2,6	
31.	3-Hlorbenzoskābe	2,7	pKa = 3,82
32.	Toluols	2,7	
33.	1-Naftols	2,7	pKa = 9,34
34.	2,3-Dihloranilīns	2,8	
35.	Hlorbenzols]	2,8	
36.	Alilfenilēteris	2,9	
37.	Brombenzols	3,0	

▼B

Nr.	Standartviela	log P_{ow}	pKa
38.	Etilbenzols	3,2	
39.	Benzofenons	3,2	
40.	4-Fenilfenols	3,2	pKa = 9,54
41.	Timols	3,3	
42.	1,4-Dihlorbenzols	3,4	
43.	Difenilamīns	3,4	pKa = 0,79
44.	Naftalīns	3,6	
45.	Fenilbenzoāts	3,6	
46.	Izopropilbenzols	3,7	
47.	2,4,6-Trihlorfenols	3,7	pKa = 6
48.	Bifenils	4,0	
49.	Benzilbenzoāts	4,0	
50.	2,4-Dinitro-6 sec. butilfenols	4,1	
51.	1,2,4-Trihlorbenzols	4,2	
52.	Dodekānskābe	4,2	
53.	Difenilēteris	4,2	
54.	n-Butilbenzols	4,5	
55.	Fenantrēns	4,5	
56.	Fluorantrēns	4,7	
57.	Dibenzils	4,8	
58.	2,6-Difenilpiridīns	4,9	
59.	Trifenilamīns	5,7	
60.	DDT	6,2	
	Citas standartvielas ar zemu log P_{ow} vērtību		
1.	Nikotīnskābe	- 0,07	

▼B

A.9. UZLIESMOŠANAS TEMPERATŪRA

1. METODE

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par vielas uzliesmojamību. Šī metode ir izmantojama šķidrumiem, kuru tvaiki var uzliesmot aizdegšanās avotu ietekmē. Ar šeit aplūkotajām noteikšanas metodēm var iegūt ticamus rezultātus tikai tajā uzliesmošanas temperatūras diapazonā, kas noteikts katrai atsevišķai metodei.

Izraugoties noteikšanas metodi, jāņem vērā iespējas notikt ķīmiskām reakcijām starp vielu un paraugu turētāju.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Uzliesmošanas temperatūra ir zemākā atmosfēras spiedienam 101,325 kPa koriģētā temperatūra, kurā testēšanas metodē definētajos apstākļos no šķidruma izdalās tvaiki tādā daudzumā, ka testēšanas traukā veidojas uzliesmojošs tvaika/gaisa maisījums.

Mērvienības: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t atbilst ^{o}C, bet T norādīts K mērvienībās)

1.3. STANDARTVIELAS

Testējot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un pēc dažādām metodēm iegūto rezultātu salīdzināšanai.

1.4. METODES PRINCIPS

Vielu pārnes testēšanas traukā un silda vai dzesē līdz testēšanas temperatūrai konkrētajā testēšanas metodē noteiktajā kārtībā. Lai pārliecinātos, vai paraugs testēšanas temperatūrā aizdegas, veic aizdedzināšanas mēģinājumus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.5.1. **Atkārtojamība**

Atkārtojamība ir atkarīga no uzliesmošanas temperatūras intervāla un izmantotās noteikšanas metodes; līdz 2 ^{o}C.

1.5.2. **Jutība**

Jutība ir atkarīga no izmantotās noteikšanas metodes.

1.5.3. **Specifiskums**

Dažas noteikšanas metodes izmantojamas tikai noteiktā uzliesmošanas temperatūras diapazonā un ir atkarīgas no vielas īpašībām (piemēram, no viskozitātes).

▼B

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanās**

Testējamās vielas paraugu ievieto noteikšanas iekārtā saskaņā ar 1.6.3.1. un/vai 1.6.3.2. punktu.

Drošības labad, testējot stipri iedarbīgas vai toksiskas vielas, ieteicams izmantot nelielu paraugu – apm. 2 cm^3.

1.6.2. **Noteikšanas apstākļi**

Ciktāl tas atbilst drošības prasībām, aparātam jāatrodas vietā, kur nedarbojas velkme un kas ir pasargāta no caurvēja.

1.6.3. **Noteikšana**

1.6.3.1. *Līdzsvara metode*

Skatīt standartus ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Bezlīdzsvara metode*

Ābela iekārta

Skatīt BS 2000 (170. daļa), NF M07-011, NF T66-009.

Ābela-Penska iekārta

Skatīt standartus EN 57, DIN 51755 1. daļu (temperatūras diapazons 5–65 °C), DIN 51755 2. daļu (temperatūra zem 5 °C), NF M07-036.

Taga iekārta

Skatīt ASTM D 56.

Penska-Martensa iekārta

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

Piezīmes

Ja ar 1.6.3.2. punktā minēto bezlīdzsvara metodi noteiktā uzliesmošanas temperatūra ir 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, tā jāapstiprina ar līdzsvara metodi, izmantojot to pašu iekārtu.

Publicēšanai izmantojamas tikai tādas noteikšanas metodes, pēc kurām var sasniegt uzliesmošanas temperatūru.

Uzliesmošanas temperatūras noteikšanai viskoziem šķidrumiem (krāsām, sveķiem u. c.), kas satur šķīdinātājus, jālieto tikai tādas iekārtas un noteikšanas metodes, kuras ir izmantojamas viskozu šķidrumu uzliesmošanas temperatūras noteikšanai.

Skatīt standartus ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1. daļu.

▼B

2. **IEGŪTIE DATI**

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (identifikācija un piemaisījumi),

— izmantotā metode, kā arī pieļautās atkāpes no tajā noteiktajām prasībām,

— rezultāti un papildu piezīmes, kas vajadzīgas rezultātu interpretācijai.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Nav.

▼B

A.10. **UZLIESMOŠANAS SPĒJA (CIETAS VIELAS)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par testējamās vielas iespējamo sprādzienbīstamību.

Šī metode izmantojama tikai pulverveida, granulu un pastveida vielu uzliesmošanas spējas noteikšanai.

Lai nebūtu jāiekļauj visas vielas, kuras var aizdegties, bet tikai tās, kuras ātri uzliesmo vai kuru degšanas process ir īpaši bīstams, uzskata, ka pie viegli uzliesmojošām vielām pieskaitāmas tikai tādas vielas, kuru degšanas ātrums pārsniedz noteiktu robežvērtību.

Tas var būt īpaši bīstami, ja kvēlošana izplatās cauri metāla pulverim tāpēc, ka uguns ir grūti nodzēšama. Metālu pulveri jāuzskata par ļoti uzliesmojošiem, ja to masā noteiktu laiku notiek kvēlošana.

1.2. DEFINĪCIJA UN MĒRVIENĪBAS

Degšanas ilgumu norāda sekundēs.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav norādītas.

1.4. METODES PRINCIPS

Vielu izveido vismaz 250 mm garas nepārtrauktas sloksnes vai pulvera joslas veidā, un vispirms veic orientējošu testu, aizdedzinot ar gāzes degļa liesmu, lai noteiktu, vai uguns izplatās ar liesmu vai gruzdot. Ja uguns 200 mm attālumā izplatās noteiktā laikā, testēšanu veic pēc pilnas programmas, lai noteiktu degšanas ātrumu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

▼B

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Orientējoša noteikšana**

Uz nedegošas pamatplates no materiāla bez porām un zemu siltumvadītspēju vielu izveido vismaz 250 mm garas, 20 mm platas un 10 mm nepārtrauktas sloksnes vai pulvera joslas veidā. Pulvera joslu vienā galā dedzina ar karstu gāzes degļa liesmu (minimālais diametrs – 5 mm), līdz pulveris aizdegas, bet ne ilgāk par 2 minūtēm (5 minūtes metālu vai metālu sakausējumu pulveriem). Jānovēro, vai uguns 200 mm joslā izplatās 4 minūšu laikā (40 minūšu laikā metālu pulveriem). Ja viela neaizdegas un uguns neizplatās, degot ar liesmu vai gruzdot 200 mm garumā 4 minūšu (vai 40 minūšu) testēšanas laikā, viela nav uzskatāma par viegli uzliesmojošu un tā vairs nav jātestē. Ja vielā izplatās uguns pulvera joslā 200 mm garumā par 4 minūtēm īsākā laikā vai ātrāk nekā 40 minūtēs metāla pulveros, jāveic turpmāk aprakstītā procedūra (1.6.2. un turpmākajos punktos).

1.6.2. **Degšanas ātruma noteikšana**

1.6.2.1. *Sagatavošana*

Pulverveida vielas vai vielas granulu veidā nesablīvējot iepilda 250 mm garā veidnē ar trijstūra šķērsgriezumu, kuras iekšējais augstums ir 10 mm, bet platums – 20 mm. Veidnes abās pusēs garenvirzienā sānu norobežošanai piestiprina divas metāla plāksnes, kuras izvirzītas 2 mm virs trijstūra šķērsgriezuma (skatīt attēlu). Tad veidni ar pārbaudāmo vielu trīs reizes met uz cietas virsmas no 2 cm augstuma. Vajadzības gadījumā veidni pēc tam atkal piepilda. Tad noņem sānu norobežojumus un vielas pārākumu noņem. Veidnei uzliek pamatplati no nedegama materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju, apgriež otrādi un veidni noņem.

Pastveida vielas izlīdzina uz pamatplates no nedegama materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju 250 mm gara valnīša veidā ar apmēram 1 cm^2 šķērsgriezumu.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Higroskopiskas vielas pārbauda cik vien ātri iespējams, uzreiz pēc izņemšanas no taras.

1.6.2.3. *Pārbaudes norise*

Pārbaudāmās vielas valnīti ievieto velkmes skapī perpendikulāri gaisa plūsmai.

Gaisa plūsmas ātrumu noteikšanas laikā izmainīt nedrīkst, un tam jābūt pietiekami lielam, lai dūmi neiekļūtu laboratorijā. Ap iekārtu jānovieto ekrāns, kas to aizsargā no gaisa plūsmas.

Valnīti no viena gala aizdedzina ar karstu gāzes degļa liesmu (minimālais diametrs – 5 mm). Kad valnītis nodedzis 80 mm garumā, reģistrē nākamo 100 mm degšanas ilgumu.

▼B

Noteikšanu veic sešas reizes, katru reizi ņemot jaunu tīru plati, ja pozitīvs rezultāts netiek novērots ātrāk.

2. **DATI**

Novērtēšanai izmanto orientējošā izmēģinājumā (1.6.1.) noteikto degšanas ilgumu un īsāko no sešās noteikšanas reizēs (1.6.2.3.) noteiktajiem degšanas ilgumiem.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— testējamās vielas apraksts, tās fizikālais stāvoklis un mitruma saturs,

— skrīninga orientējošās testēšanas rezultāti un degšanas ātrums, ja tas noteikts,

— visas papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Pulverveida, granulētas un pastveida vielas uzskatāmas par viegli uzliesmojošām, ja degšanas laiks, kas noteikts pēc 1.6.2. punktā aprakstītās procedūras, ir mazāks par 45 sekundēm. Metālu vai to sakausējumu pulveri ir pieskaitāmi pie viegli uzliesmojošām vielām, ja tie spēj aizdegties un liesma vai reakcijas zona aptver visu paraugu ne ilgāk kā 10 minūtēs.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

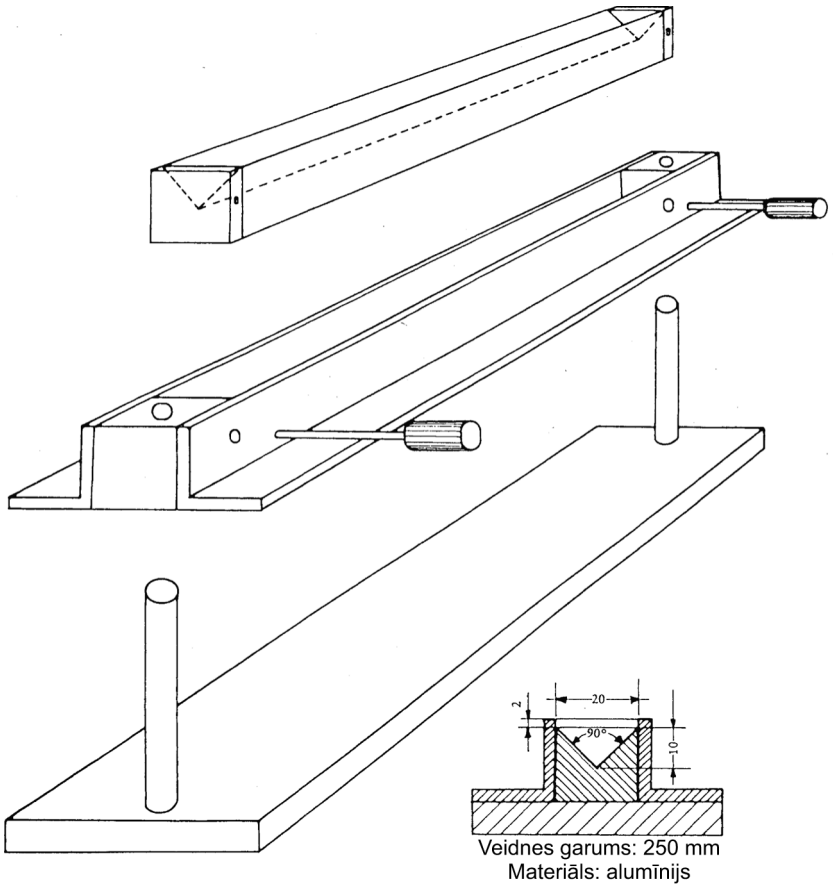
▼B

Papildinājums

Attēls

Veidne un papildu aprīkojums degšanas ilguma noteikšanai

(Visi izmēri norādīti milimetros)



▼B

A.11. UZLIESMOŠANAS SPĒJA (GĀZĒM)

1. METODE

1.1. IEVADS

Pēc šīs metodes nosaka, vai gāzu maisījumi ar gaisu istabas temperatūrā (apm. 20 °C) un atmosfēras spiedienā ir uzliesmojoši un, ja tie ir uzliesmojoši, tad kādā koncentrāciju intervālā. Palielinot testējamās gāzes koncentrāciju gaisā, pārbauda, kā maisījums reaģē uz elektrisku dzirksteli, un novēro, vai notiek aizdegšanās.

1.2. DEFINĪCIJA UN MĒRVIENĪBAS

Uzliesmošanas intervāls ir koncentrāciju intervāls starp apakšējo un augšējo sprādzienbīstamības robežu. Apakšējā un augšējā sprādzienbīstamības robeža ir uzliesmojošas gāzes tāda robežkoncentrācija gaisā, kurā liesma tālāk neizplatās.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav noteiktas.

1.4. METODES PRINCIPS

Gāzes koncentrāciju gaisā pakāpeniski palielina un pēc katras palielināšanas pārbauda, kā maisījums reaģē uz elektrisku dzirksteli.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Testēšanas trauks ir otrādi apgriezts stikla cilindrs ar minimālo iekšējo diametru 50 mm un minimālo augstumu 300 mm. Attālums starp aizdedzināšanas elektrodiem ir 3 līdz 5 mm, un tie novietoti 60 mm attālumā no cilindra apakšas. Cilindrs ir aprīkots ar liekā spiediena vārstuli. Iekārta ir jānodrošina ar aizsargvairogu, lai samazinātu sprādziena radītos bojājumus.

Kā aizdegšanās avots kalpo indukcijas dzirkstele, kuras ilgums ir 0,5 s un ko ģenerē augstsprieguma transformators ar izejas spriegumu 10–15 kV (maksimālā ieejas jauda 300 W). Noteikšanai piemērota aparatūra aprakstīta (2).

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

▼B

1.6.3. **Pārbaudes norise**

Ar dozētājsūkņa palīdzību stikla cilindrā ievada noteiktas koncentrācijas gāzes un gaisa maisījumu. Maisījumā uzšķiļ dzirksteli un novēro, vai liesma spēj atdalīties no aizdegšanās avota un patstāvīgi izplatīties tālāk. Gāzes koncentrāciju pakāpeniski palielina par 1 tilp. %, līdz notiek aizdegšanās iepriekš aprakstītajā veidā.

Ja gāzveida vielas ķīmiskā struktūra liecina, ka tā varētu nebūt uzliesmojoša, un ir iespējams aprēķināt stehiometrisko attiecību maisījumam ar gaisu, pakāpeniski ar soli 1 tilp. % testē maisījumus, kuru koncentrācija ir 10 % virs un zem stehiometriskās attiecības.

2. **DATI**

Liesmas izplatīšanās ir vienīgais drošais rādītājs šīs īpašības noteikšanai.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— izmantotās iekārtas apraksts, norādot tās izmērus,

— temperatūra, kurā veikta testēšana,

— pārbaudītās koncentrācijas un iegūtie rezultāti,

— pārbaudes rezultāts: gāze nav uzliesmojoša vai ir viegli uzliesmojoša,

— ja izdarīts secinājums, ka gāze nav uzliesmojoša, norāda koncentrāciju intervālu, kurā tā testēta ar soli 1 tilp. %,

— protokolā jānorāda informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

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

▼B

A.12. **UZLIESMOŠANAS SPĒJA (KONTAKTĀ AR ŪDENI)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Ar šo metodi var noteikt, vai, vielai reaģējot ar ūdeni, bīstamā daudzumā izdalās viegli uzliesmojošas gāzes.

Šo metodi var izmantot gan cietu vielu, gan šķidrumu uzliesmošanas spējas noteikšanai. Šī metode nav izmantojama tādu vielu testēšanai, kuras spontāni aizdegas saskarē ar gaisu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Viegli uzliesmojošas vielas: vielas, kas saskarē ar ūdeni vai mitru gaisu izdala viegli uzliesmojošas gāzes bīstamā daudzumā vismaz 1 l/kg stundā.

1.3. METODES PRINCIPS

Vielu testē posmos turpmāk aprakstītajā secībā; ja notiek aizdegšanās, testēšana nākamajos posmos nav jāturpina. Ja zināms, ka viela ar ūdeni strauji nereaģē, testēšanu veic, kā aprakstīts 4. posmā (1.3.4.).

1.3.1. **1. posms**

Testējamo vielu ievieto tvertnē ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas.

1.3.2. **2. posms**

Testējamo vielu uzliek uz filtrpapīra, kas peld traukā ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā, un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas. Filtrpapīru izmanto tikai tāpēc, lai viela būtu vienkopus, kas palielina aizdegšanās iespējamību.

1.3.3. **3. posms**

No testējamās vielas izveido apmēram 2 cm augstu kaudzīti 3 cm diametrā. Uz kaudzītes uzpilina ūdeni un pārbauda, vai izdalījusies gāze aizdegas.

1.3.4. **4. posms**

Testējamo vielu sajauc ar destilētu ūdeni 20 °C temperatūrā un septiņu stundu laikā ik pēc stundas mēra gāzes izdalīšanās ātrumu. Ja gāze izdalās nevienmērīgi vai izdalīšanās ātrums pēc 7 stundām palielinās, mērījumu ilgums jāpagarina, bet ne vairāk kā līdz 5 dienām. Testēšanu var pārtraukt jebkurā laikā, kad gāzes izdalīšanās ātrums kļūst lielāks par 1 l/kg stundā.

▼B

1.4. STANDARTVIELAS

Nav noteiktas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **1. posms**

1.6.1.1. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.1.2. *Pārbaudes norise*

Nelielu daudzumu (ap 2 mm diametrā) testējamās vielas ievieto tvertnē ar destilētu ūdeni. Novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā ir pieskaitāma bīstamām vielām.

1.6.2. **2. posms**

1.6.2.1. *Aprīkojums*

Jebkurā piemērotā traukā, piemēram, iztvaicēšanas bļodiņā (diametrs 100 mm) ar destilētu ūdeni, uz ūdens virsmas uzliek filtrpapīru.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.2.3. *Pārbaudes norise*

Nelielu daudzumu testējamās vielas (ap 2 mm diametrā) novieto filtrpapīra vidū. Novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā ir pieskaitāma bīstamām vielām.

1.6.3. **3. posms**

1.6.3.1. *Pārbaudes apstākļi*

Testēšanu veic istabas temperatūrā (apm. 20 °C).

1.6.3.2. *Pārbaudes norise*

No testējamās vielas izveido apmēram 2 cm augstu kaudzīti (3 cm diametrā) ar iedobi virsējā daļā. Šajā iedobē iepilina ūdeni un novēro, vai i) izdalās gāze un vai ii) notiek gāzes aizdegšanās. Ja novēro gāzes aizdegšanos, turpmāka vielas testēšana nav nepieciešama, jo tad tā pieskaitāma bīstamām vielām.

▼B

1.6.4. **4. posms**

1.6.4.1. *Aprīkojums*

Sastāda attēlā parādīto aparātu.

1.6.4.2. *Pārbaudes apstākļi*

Jāpārliecinās, ka pārbaudāmās vielas iepakojums nesatur pulveri (daļiņu lielums < 500 μm). Ja pulveris veido vairāk nekā 1 tilp. % no kopējā daudzuma vai ja paraugs ir sagulējies, tas pirms testēšanas jāsaberž pulverī, lai samazinātu daļiņu lielumu uzglabāšanas laikā un pirms izmantošanas; citādi viela jātestē veidā, kādā tā saņemta bez papildu sagatavošanas. Testēšana jāveic istabas temperatūrā (20 °C) un atmosfēras spiedienā.

1.6.4.3. *Pārbaudes norise*

Aparāta pilināmajā piltuvē ielej 10 līdz 20 ml ūdens, bet koniskajā kolbā pārnes 10 g testējamās vielas. Ar jebkuriem piemērotiem līdzekļiem mēra izdalījušās gāzes tilpumu. Koniskajā kolbā ielaiž ūdeni, atverot pilināmās piltuves krānu, un iedarbina hronometru. Izdalījušās gāzes daudzumu septiņu stundu laikā mēra ik pēc stundas. Ja šajā laikā izdalītais gāzes daudzums mainās vai arī minētā perioda beigās gāzes izdalīšanās ātrums palielinās, mērījumi jāturpina līdz piecām dienām. Ja mērījumu laikā gāzes izdalīšanās ātrums pārsniedz 1 l/kg stundā, testēšanu var pārtraukt. Testēšana jāveic trīs reizes.

Ja gāzes ķīmiskais sastāvs nav zināms, jāveic tās analīze. Ja gāze satur viegli uzliesmojošus komponentus un nav zināms, vai arī pats maisījums ir viegli uzliesmojošs, jāpagatavo tāda paša sastāva maisījums un tas jāpārbauda pēc A.11. nodaļā aprakstītās metodes.

2. **DATI**

Viela uzskatāma par bīstamu, ja:

— kādā testēšanas posmā notiek tā pašaizdegšanās

vai

— izdalās uzliesmojoša gāze ar ātrumu, kas ir lielāks par 1 l/kg vielas stundā.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— sīkas ziņas par testējamās vielas sagatavošanu uzliesmošanas spējas noteikšanai,

▼B

— testēšanas rezultāti (1., 2., 3. un 4. posmā),

— izdalījušās gāzes sastāvs,

— gāzes izdalīšanās ātrums, ja veikts testēšanas 4. posms (1.6.4.),

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

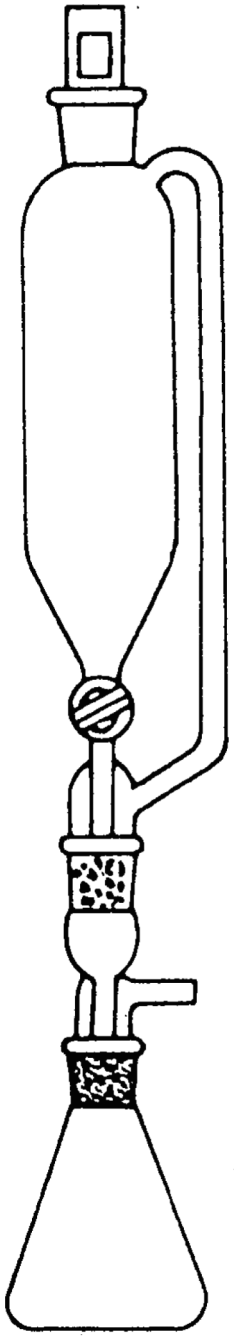
(2) NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Papildinājums

Attēls

Aprīkojums



▼B

A.13. **CIETVIELU UN ŠĶIDRUMU PIROFORĀS ĪPAŠĪBAS**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Testēšanas metode izmantojama cietvielām un šķidrām vielām, kurām nelielos daudzumos pēc saskares ar gaisu istabas temperatūrā (apm. 20 °C) notiek to pašaizdegšanās.

Šo metodi neizmanto vielām, kurām, lai notiku pašaizdegšanās, jāatrodas kontaktā ar gaisu istabas temperatūrā vai paaugstinātā temperatūrā vairākas stundas vai dienas.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Uzskata, ka vielas ir piroforas, ja tās 1.6. punktā aprakstītajos apstākļos aizdegas vai izraisa pārogļošanos.

Var būt vajadzīgs noteikt šķidrumu pašaizdegšanās spēju pēc metodes A.15. "Pašaizdegšanās temperatūra (šķidrumiem un gāzēm)".

1.3. STANDARTVIELAS

Nav norādītas.

1.4. METODES PRINCIPS

Cietvielu vai vielu, kas ir šķidruma veidā, pievieno inertam nesējam un uz piecām minūtēm istabas temperatūrā novieto saskarē ar gaisu. Ja vielas, kas ir šķidrumi, neaizdegas, tās absorbē uz filtrpapīra un piecas minūtes istabas temperatūrā (apm. 20 °C) novieto saskarē ar gaisu. Ja cietviela vai šķidrums aizdegas vai pārogļo filtrpapīru, viela uzskatāma par piroforu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Atkārtojamība: drošības apsvērumu dēļ viela tiek uzskatīta par piroforu, ja tiek iegūts viens pozitīvs rezultāts.

1.6. TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Istabas temperatūrā (apm. 20 °C) porcelāna bļodiņā (diametrs apm. 10 cm) iepilda diatomītu, lai tā augstums būtu aptuveni 5 mm.

Piezīme

Diatomītu vai kādu citu līdzīgu, viegli pieejamu inertu vielu izmanto par augsnes aizstājēju, modelējot augsnes piesārņošanu ar pārbaudāmo vielu avārijas gadījumā.

Sauss filtrpapīrs vajadzīgs tādu šķidrumu testēšanai, kuri uz inerta nesēja neaizdegas kontaktā ar gaisu.

▼B

1.6.2. **Noteikšana**

a) *Pulverveida cietvielas*

Pulverveida vielu (1–2 cm^3) ber no aptuveni 1 m augstuma uz ugunsdrošas virsmas un novēro, vai tā aizdegas krītot vai piecu minūšu laikā pēc nosēšanās.

Ja nenotiek aizdegšanās, mēģinājumu atkārto sešas reizes.

b) *Šķidrumi*

Pārbaudāmo šķidrumu (apm. 5 cm^3) lej iepriekš sagatavotā porcelāna bļodiņā un piecas minūtes novēro, vai šī viela aizdegas.

Ja sešos mēģinājumos aizdegšanās nenotiek, veic šādas pārbaudes:

ar šļirci 0,5 ml testējamā parauga pārnes uz robota filtrpapīra un novēro, vai pēc tam piecu minūšu laikā notiek filtrpapīra aizdegšanās vai pārogļošanās. Ja nenotiek aizdegšanās vai pārogļošanās, mēģinājumu atkārto trīs reizes.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Pārbaudi var pārtraukt, tiklīdz kādā no pārbaudēm iegūst pozitīvu rezultātu.

2.2. NOVĒRTĒŠANA

Viela uzskatāma par piroforu, ja viela piecu minūšu laikā pēc pievienošanas inertam nesējam gaisā aizdegas vai šķidra viela pārogļo vai aizdedzina filtrpapīru gaisa klātienē piecās minūtēs pēc tās uznešanas filtrpapīram.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— testēšanas rezultāti,

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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. **SPRĀDZIENBĪSTAMĪBA**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Metodē aprakstīta testēšanas shēma, pēc kuras nosaka cietvielu un pastveida vielu sprādzienbīstamību, uz tām iedarbojoties liesmai (termiskā jutība) vai triecieniem vai berzei (jutība uz mehānisku iedarbību), un šķidru vielu sprādzienbīstamību, uz tām iedarbojoties ar liesmu vai triecienu.

Metode paredz trīs dažādas pārbaudes:

a) termiskās jutības pārbaudi (1);

b) trieciena iedarbības mehāniskās jutības pārbaudi (1);

c) berzes iedarbības mehāniskās jutības pārbaudi (1).

Ar šo metodi var iegūt datus, kas ļauj novērtēt eksplozijas iespējamību dažu plaši izplatītu faktoru ietekmē. Metode nav paredzēta, lai noteiktu, vai viela ir sprādzienbīstama jebkuros apstākļos.

Metode piemērota, lai noteiktu vielas sprādzienbīstamību (termisko jutību un jutību uz mehānisko iedarbību) konkrētos apstākļos, kas norādīti direktīvā. Tā pamatojas uz pasaulē plaši izmantotiem vairāku veidu aparātiem, ar kuriem iegūst ticamus rezultātus. Tajā pašā laikā ir jāatzīst, ka šī metode nesniedz galīgu atbildi. Var izmantot ne tikai šeit noteiktos, bet arī citus aparātus, ja tie ir starptautiski atzīti un ar tiem iegūtie rezultāti korelē ar rezultātiem, kuri iegūti ar šeit noteiktajiem aparātiem.

Testēšana nav jāveic gadījumos, kad ir pieejami termodinamiskie dati (piemēram, rašanās siltums, sadalīšanās siltums) un/vai molekulā nav dažas reaģētspējīgas grupas (2), kas dod pietiekamu pamatu uzskatīt, ka viela nevar strauji sadalīties, izdalot gāzes vai siltumenerģiju (t. i., viela nav sprādzienbīstama). Šķidrumiem nav jāveic tests mehāniskajai jutībai uz berzes iedarbību.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Sprādzienbīstamas vielas:

vielas, kuras var eksplodēt, uz tām iedarbojoties liesmai, vai kuras ir jutīgas pret trieciena vai berzes iedarbību noteiktajā aparatūrā (vai kuras ir jutīgākas uz mehānisko iedarbību nekā 1,3-dinitrobenzols alternatīvā aparatūrā).

1.3. STANDARTVIELAS

Berzes un trieciena iedarbības noteikšanai: 1,3-dinitrobenzols, tehnisks kristālisks produkts, kas iziet cauri 0,5 mm sietam.

Berzes un trieciena iedarbības testēšanas otrajai sērijai: perhidro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazīns (RDX, heksogēns, ciklonīts – *CAS* 121-82-4), pārkristalizēts no cikloheksanona šķīduma ūdenī, un kas mitrā veidā sijājot iziet cauri a 250 μm sietam un paliek uz 150 μm sieta, žāvēts 103 ± 2 °C temperatūrā (četras stundas).

▼B

1.4. METODES PRINCIPS

Drošu apstākļu noskaidrošanai, testējot jutību pret triju veidu iedarbību, vispirms jāveic orientējošas pārbaudes.

1.4.1. **Drošas apiešanās pārbaudes (3)**

Pirms veikt galvenās pārbaudes, drošības apsvērumu dēļ ļoti mazus vielas paraugus (apm. 10 mg) vaļējā veidā silda gāzes degļa liesmā, pakļauj trieciena iedarbībai, izmantojot āmuru un laktu, un berzes iedarbībai jebkāda veida berzes iekārtā. Tas nepieciešamas, lai noskaidrotu, vai viela ir tik jutīga un sprādzienbīstama, ka noteiktie jutības testi, jo īpaši jutība pret paaugstinātas temperatūras iedarbību, ir tik liela, ka jāveic piesardzības pasākumi, lai to laikā neciestu operators.

1.4.2. **Termiskā jutība**

Pēc šīs metodes vielu karsē tērauda caurulē, kas noslēgta ar plāksnēm, kurās ir dažāda diametra atveres, lai noteiktu, vai viela var eksplodēt, intensīvi sildot definēti norobežotā telpā.

1.4.3. **Mehāniskā jutība (pret triecienu)**

Pēc šīs metodes vielu pakļauj trieciena iedarbībai, ko rada noteikta lieluma masa, krītot no noteikta augstuma.

1.4.4. **Mehāniskā jutība (pret berzi)**

Pēc šīs metodes cietvielu vai pastveida vielu pakļauj berzei starp standartvirsmām, ievērojot norādītos slodzes un savstarpējās kustības apstākļus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav noteikti.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Termiskā jutība (pret liesmas iedarbību)**

1.6.1.1. *Aprīkojums*

Aparāts sastāv no vienreizlietojamas tērauda caurules un atkārtoti izmantojamas noslēgierīces (1. attēls), kas uzstādīta sildierīcei un aizsargierīcei. Caurule ir izvilkta no lokšņu tērauda (skatīt papildinājumu), un tās iekšējais diametrs ir 24 mm, garums 75 mm un sieniņu biezums 0,5 mm. Caurules vaļējam galam ir atloks, pie kura stiprina mezglu, kurā ietilpst plāksne ar atverēm. Tas sastāv no spiedienizturīgas plāksnes ar atverēm, kurā ir centrālā atvere un kura stingri piestiprināta caurulei ar divdaļīgu skrūvju savienojumu (uzgrieznis un vītņsavienojums). Uzgrieznis un vītņsavienojums izgatavoti no hroma-mangāna tērauda (skatīt papildinājumu), kas nerada dzirksteles līdz 800 °C. Atveres plates ir 6 mm biezas, izgatavotas no karstumizturīga tērauda (skatīt papildinājumu) un ir ar dažādu atveres diametru.

▼B

1.6.1.2. *Testēšanas apstākļi*

Parasti vielu testē tādā paša veidā, kādā tā saņemta, lai gan dažkārt, piemēram, ja tā ir sapresēta, kausēta vai citādi sablīvēta, var būt vajadzīgs vielu pirms testēšanas sasmalcināt.

Cietvielu testēšanai izmantojamā materiāla masu nosaka, izmantojot divpakāpju procedūru pēc sausā paņēmiena. Tarētā caurulē iepilda 9 cm^3 vielas, ko sablīvē ar 80 N spēku, ko pieliek visam caurules šķērsgriezumam. Drošības apsvērumu dēļ vai gadījumos, kad parauga fizikālais stāvoklis pēc saspiešanas var izmainīties, var lietot citus uzpildīšanas paņēmienus; piemēram, ja viela ir ļoti jutīga pret berzes iedarbību, to blīvēt nedrīkst. Ja materiāls ir saspiežams, pieliek un sablīvē tā papildu daudzumu, līdz caurule ir piepildīta līdz 55 mm no caurules augšmalas. Nosaka kopējo vielas masu, kas vajadzīga caurules piepildīšanai līdz 55 mm līmenim, un pievieno vēl divas papildu parauga daļas, kuras katru sablīvē ar 80 N spēku. Tad materiālu pēc vajadzības pievieno sablīvējot vai izņem ārā tā, lai caurule būtu piepildīta līdz 15 mm līmenim no augšmalas. Tad veic otru noteikšanu pēc sausā paņēmiena, sākot ar trešdaļu kopējās masas, kas noteikta pirmajā reizē, un to sablīvējot. Pievieno vēl divas parauga daļas, sablīvējot ar 80 N spēku, un vielas līmeni caurulē noregulē līdz 15 mm no augšmalas, pēc vajadzības vielu pievienojot vai izņemot. Katram izmēģinājumam izmanto cietvielas daudzumu, kas noteikts otrajā mēģinājumā pēc sausā paņēmiena; piepildīšanu veic trijās vienādās daļās, katru no tām saspiežot līdz 9 cm^3 ar spēku, kas vajadzīgs šādam nolūkam. (To var veikt, izmantojot atstarpes gredzenus.)

Šķidrumus un gelus caurulē iepilda līdz 60 mm augstumam, īpaši raugoties, lai gelos neizveidotos tukšumi. Vītņsavienojumu caurulei uzliek no apakšas, ievieto plāksni ar vajadzīgā lieluma atveri, un pēc ieziešanas ar nelielu daudzumu molibdēna disulfīda ziedes pievelk uzgriezni. Noteikti jāpārbauda, vai testējamā viela nav nokļuvusi starp plāksni un atloku vai uz vītnēm.

Karsēšanai izmanto propānu no gāzes balona, kas aprīkots ar spiediena reduktoru (60 līdz 70 mbar) un plūsmas mērītāju un tiek vienādi padots uz četriem gāzes degļiem (vizuāli novērtējot pēc degļu liesmas). Degļus novieto apkārt testēšanas kamerai, kā parādīts 1. attēlā. Visu četru degļu kopējais propāna patēriņš ir apmēram 3,2 litri propāna minūtē. Var izmantot citas gāzes un citādus degļus, tomēr karsēšanas ātrumam jāatbilst 3. attēlā norādītajam. Visiem aparātiem periodiski jāpārbauda karsēšanas ātrums, izmantojot caurules ar dibutilftalāta pildījumu, kā parādīts 3. attēlā.

1.6.1.3. *Pārbaužu norise*

Katru noteikšanu veic tik ilgi, līdz caurule pārsprāgst vai caurule ir karsēta piecas minūtes. Tests, kurā caurule sasprāgst vismaz trijās daļās, kuras dažkārt var turēties kopā ar šaurām metāla sloksnēm, kā parādīts 2. attēlā, tiek novērtēts par sprādzienu. Tests, kurā rodas mazāk caurules gabalu vai tā nesaplīst, netiek novērtēts par sprādzienu.

▼B

Vispirms trīs reizes testu veic, izmantojot plāksni ar atveri 6,0 mm diametrā, un, ja šādā veidā sprādzieni nenotiek, testu veic vēl trīs reizes, izmantojot plāksni ar atveri 2,0 mm diametrā. Jebkurā izmēģinājumu sērijā notiekot sprādzienam, testēšanu turpināt nav vajadzīgs.

1.6.1.4. *Vērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja sprādziens notiek kādā no iepriekšminēto izmēģinājumu sērijām.

1.6.2. **Mehāniskā jutība (pret triecienu)**

1.6.2.1. *Aparatūra (4. attēls)*

Svarīgākās krītošā āmura iekārtas sastāvdaļas ir liets tērauda bloks ar pamatni, lakta, statnis, vadotnes, krītoši atsvari, palaišanas ierīce un parauga turētājs. Tērauda lakta 100 mm (diametrs) × 70 mm (augstums) ir pieskrūvēta tērauda blokam 230 mm (garums) × 250 mm (platums) × 200 mm (augstums) uz lietas pamatnes 450 mm (garums) × 450 mm (platums) × 60 mm (augstums). Statnis, kas izgatavots no izvilktas bezšuves tērauda caurules, tiek iestiprināts turētājā, kas pieskrūvēts tērauda blokam. Ar četrām enkurskrūvēm iekārta piestiprināta masīvam betona blokam 60 × 60 × 60 cm tā, lai vadotņu sliedes būtu pilnīgi vertikālas un krītošie atsvari brīvi kristu. Lietošanai izmantojami 5 un 10 kg masīva tērauda atsvari. Atsvaru triecienvirsma ir no rūdīta tērauda, HRC 60 līdz 63, ar minimālo diametru 25 mm.

Testējamo paraugu ievieto triecienierīcē, kura sastāv no diviem vienam virs otra novietotiem koaksiāliem masīva tērauda cilindriem dobā tērauda cilindrveida vadotnē. Masīva tērauda cilindru diametrs ir 10 (- 0,003, - 0,005) mm un augstums 10 mm, ar pulētām virsmām, noapaļotām šķautnēm (noapaļojuma rādiuss 0,5 mm) un cietību HRC 58 līdz 65. Dobā cilindra ārējam diametram jābūt 16 mm, pulētu urbumu ar izmēru 10 (+ 0,005, + 0,010) mm un augstumu 13 mm. Triecienierīce samontēta uz starplaktas (diametrs 26 mm un augstums 26 mm), kas izgatavota no tērauda un centrēta, izmantojot gredzenu ar izgriezumiem, pa kuriem izplūst dūmiem.

1.6.2.2. *Pārbaudes apstākļi*

Parauga tilpums ir 40 mm^3 vai jebkurš tilpums, kas piemērots attiecīgajām alternatīvajām iekārtām. Cietvielas jātestē sausā veidā, un tās sagatavojamas šādi:

a) vielas pulvera veidā sijā (caur 0,5 mm sietu); testēšanai izmanto visu caur sietu izgājušo materiālu;

b) presētas, kausētas vai citādi sablīvētas vielas sasmalcina gabaliņos un sijā; testēšanai izmanto daļiņu frakciju ar izmēru 0,5 līdz 1 mm, un tai jāatbilst sākotnējai vielai.

Vielas, kuras parasti piegādā pastveidā, ja iespējams, jātestē sausas vai jebkurā gadījumā iespējami pilnīgi atdalot atšķaidītāju. Šķidras vielas testē ar 1 mm atstarpi starp augšējo un apakšējo cilindru.

▼B

1.6.2.3. *Pārbaužu norise*

Veic sešu izmēģinājumu sēriju, metot 10 kg lielu masu no 0,40 m augstuma (40 J). Ja sešos izmēģinājumos ar 40 J iegūst eksploziju, jāveic vēl seši izmēģinājumi, metot 5 kg masu no 0,15 m augstuma (7,5 J). Citos aparātos paraugu salīdzina ar izraudzīto standartvielu, ievērojot noteiktu procedūru (piemēram, turp un atpakaļ paņēmienu u. c.).

1.6.2.4. *Novērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja eksplozija (ar aizdegšanos un/vai novērojums, kas uzskatāms par eksploziju) notiek vismaz vienreiz jebkurā no izmēģinājumiem, izmantojot iepriekš noteikto iekārtu, vai paraugs ir jutīgāks pret trieciena iedarbību nekā 1,3-dinitrobenzolu vai RDX (heksogēnu) alternatīvā izmēģinājumā.

1.6.3. **Mehāniskā jutība (pret berzi)**

1.6.3.1. *Aparatūra (5. attēls)*

Berzes iekārta sastāv no lietas tērauda pamatplates, kurai uzmontēta berzes ierīce. Tā sastāv no nekustīgas porcelāna kājas un kustīgas plates no porcelāna. Porcelāna plate ir nostiprināta rāmī, kas pārvietojas divās vadotnēs. Rāmi caur savienotājstieni, ekscentra mehānismu un piemērotu pārvadu piedzen elektromotors tā, ka plāksni tikai vienreiz pārvieto turp un atpakaļ un uz priekšu aiz porcelāna kājas 10 mm. Porcelāna kāju var slogot ar, piemēram, 120 vai 360 N.

Līdzenās porcelāna plates ir izgatavotas no tehniskā porcelāna (raupjums 9 līdz 32 μm), un to izmēri ir 25 mm (garums) × 25 mm (platums) × 5 mm (augstums). Cilindriskā porcelāna kāja arī ir izgatavota no baltā tehniskā porcelāna, un tā ir 15 mm gara, 10 mm diametrā un raupjām sfēriskām galu virsmām ar noapaļojuma rādiusu 10 mm.

1.6.3.2. *Pārbaudes apstākļi*

Parauga tilpums ir 10 mm^3 vai jebkurš tilpums, kas piemērots attiecīgajām alternatīvajām iekārtām.

Cietvielas jātestē sausā veidā, un tās sagatavojamas šādi:

a) vielas pulvera veidā sijā (caur 0,5 mm sietu); testēšanai izmanto visu caur sietu izgājušo materiālu;

b) presētas, kausētas vai citādi sablīvētas vielas sasmalcina gabaliņos un sijā; testēšanai izmanto frakciju ar daļiņu izmēru < 0,5 mm.

Ja iespējams, vielas pastu veidā ir jātestē sausas. Ja vielas testēšanai nevar sagatavot sausā veidā, pastas (pēc iespējami pilnīgas atšķaidītāja atdalīšanas) testē ar šablonu sagatavotas plēves veidā, kuras biezums ir 0,5 mm, platums 2 mm, bet garums 10 mm.

▼B

1.6.3.3. *Pārbaužu norise*

Porcelāna kāju novieto uz testējamā parauga un slogo. Porcelāna plāksnītē sūkļa atstātajām švīkām pārbaudes laikā jābūt vērstām šķērsvirzienā attiecībā pret kustības virzienu. Jāpārliecinās, ka kāja atspiežas pret paraugu, ka zem kājas ir pietiekami daudz pārbaudāmās vielas un ka plate zem kājas kustas pareizā virzienā. Pastveida vielas platei uzklāj ar 0,5 mm biezuma kalibru, kura spraugas izmērs ir 2 × 10 mm. Porcelāna platei zem porcelāna kājas 0,44 sekunžu laikā jāpārvietojas turp un atpakaļ 10 mm. Plates virsmas daļas un kāju drīkst izmantot tikai vienreiz; katras kājas abi gali izmantojami diviem izmēģinājumiem, bet katra no abām plates virsmām – trijiem izmēģinājumiem.

Veic sešu izmēģinājumu sērijas ar 360 N slodzi. Ja šo sešu izmēģinājumu laikā tiek konstatēts pozitīvs rezultāts, veic vēl sešu izmēģinājumu sēriju ar 120 N slodzi. Citos aparātos paraugu salīdzina ar izraudzīto standartvielu, ievērojot noteiktu procedūru (piemēram, turp un atpakaļ paņēmienu u. c.).

1.6.3.4. *Novērtēšana*

Testēšanas rezultāts uzskatāms par pozitīvu, ja eksplozija (krakšķēšana un/vai aizdegšanās novērojums uzskatāmi par eksploziju) notiek vismaz vienreiz jebkurā no izmēģinājumiem, izmantojot iepriekš noteikto berzes iekārtu, vai atbilst ekvivalentiem kritērijiem alternatīvā berzes izmēģinājumā.

2. **DATI**

Viela principā uzskatāma par sprādzienbīstamu direktīvas nozīmē, ja pozitīvs testēšanas rezultāts iegūts termiskajā, trieciena vai berzes izmēģinājumā.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— testējamās vielas identifikācija, sastāvs, tīrība, mitruma saturs u. c.,

— parauga fizikālais stāvoklis, norādes par tā sasmalcināšanu un/vai sijāšanu,

— termiskās jutības testēšanas laikā veiktie novērojumi (piemēram, parauga masa, fragmentu skaits u. c.),

— mehāniskās jutības testēšanas laikā veiktie novērojumi (piemēram, dūmu veidošanās ievērojamā daudzumā, pilnīga sadalīšanās bez atlikuma, uzliesmošana, dzirksteļošana, krakšķēšana u. c.),

— visos testēšanas veidos iegūtie rezultāti,

— ja izmantota cita iekārta, šādas izvēles zinātniskais pamatojums, kā arī pierādījums tam, ka iegūtie rezultāti ir salīdzināmi ar rezultātiem, kas iegūti ar iekārtu, kura ieteikta šīs pārbaudes veikšanai,

▼B

— jebkuras noderīgas piezīmes, piemēram, atsauces uz līdzīgu produktu pārbaudēm, kas var noderēt pienācīgai rezultātu interpretācijai,

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Testēšanas pārskatā jānorāda visi rezultāti, kas uzskatāmi par kļūdainiem, netipiskiem vai nereprezentatīviem. Ja kādi rezultāti nav iekļaujami pārskatā, tas jāpaskaidro, kā arī jānorāda visi citos vai papildu izmēģinājumos iegūtie rezultāti. Ja netipisku rezultātu izskaidrot nevar, tas jāpieņem pēc nominālvērtības un pēc tā viela attiecīgi jāklasificē.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 6–13 and p. 30–42.

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

▼B

Papildinājums

Termiskās jutības testēšanai vajadzīgo materiālu testēšana (skatīt *DIN* 1623)

1. Caurule: materiāla specifikācija Nr. 1.0336.505 g.

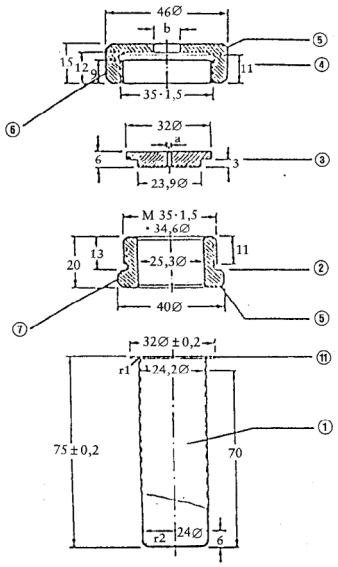
2. Plate ar atveri: materiāla specifikācija Nr. 1.4873.

3. Vītņsavienojums un uzgrieznis: materiāla specifikācija Nr. 1.3817.

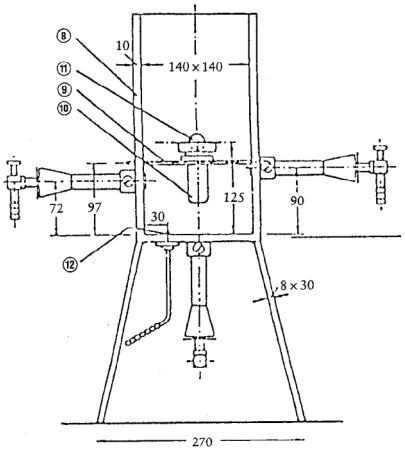
1. attēls

Termiskās jutības testēšanas iekārta

(visi izmēri norādīti milimetros)



I.a att. Tērauda caurule ar piederumiem



1.b att. Sildīšanas un aizsargierīce

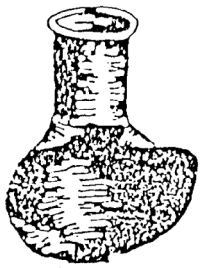
(1) caurule
(1a) ārējais atloks
(2) vītņsavienojums; vītne ar mazu berzi
(3) plate ar atveri a = 2,0 vai 6,0 mm diam.
(4) uzgrieznis b = 10 mm diam.
(5) slīpa virsma
(6) 2 plakanas virsmas 41. izmēra uzgriežņu atslēgai
(7) 2 plakanas virsmas 36. izmēra uzgriežņu atslēgai
(8) pret plaisāšanu izturīga kamera
(9) 2 balsta stieņi caurulei
(10) samontēta caurule
(11) vieta aizmugurējam deglim; pārējie degļi attēlā redzami
(12) žikleris

▼B

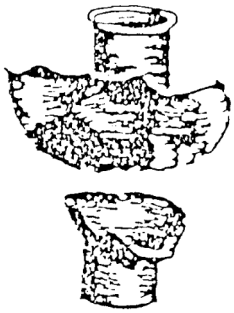
2. attēls

Termiskās jutības tests

(fragmentācijas paraugi)



Nav eksplozijas



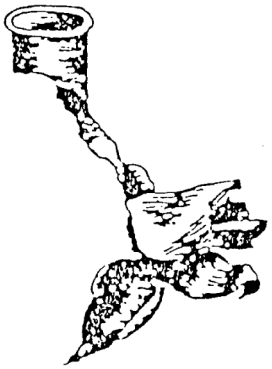
Nav eksplozijas



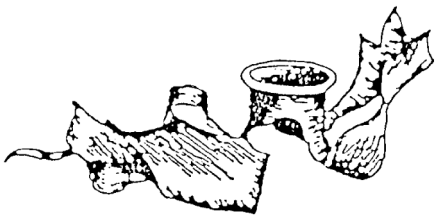
Eksplozija



Eksplozija



Eksplozija

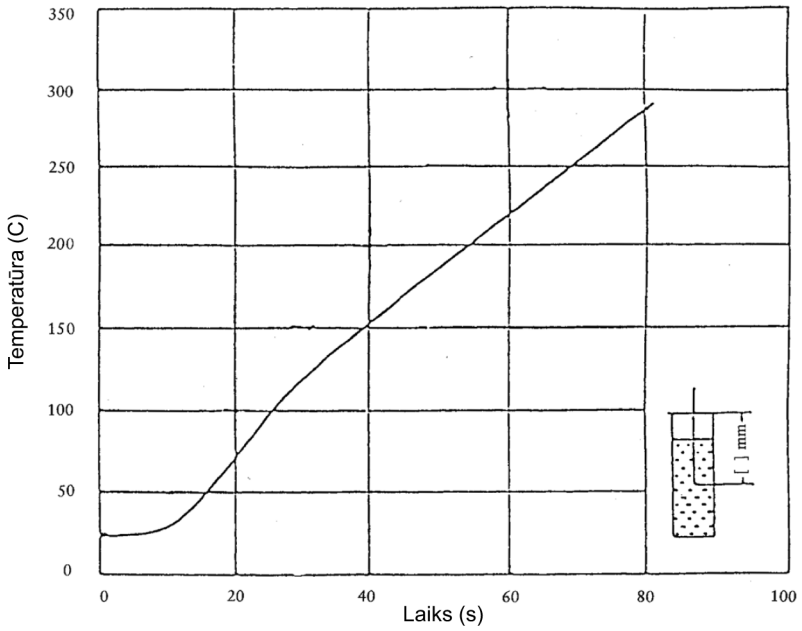


Eksplozija

▼B

3. attēls

Sildīšanas ātruma kalibrēšana termiskās jutības testēšanai



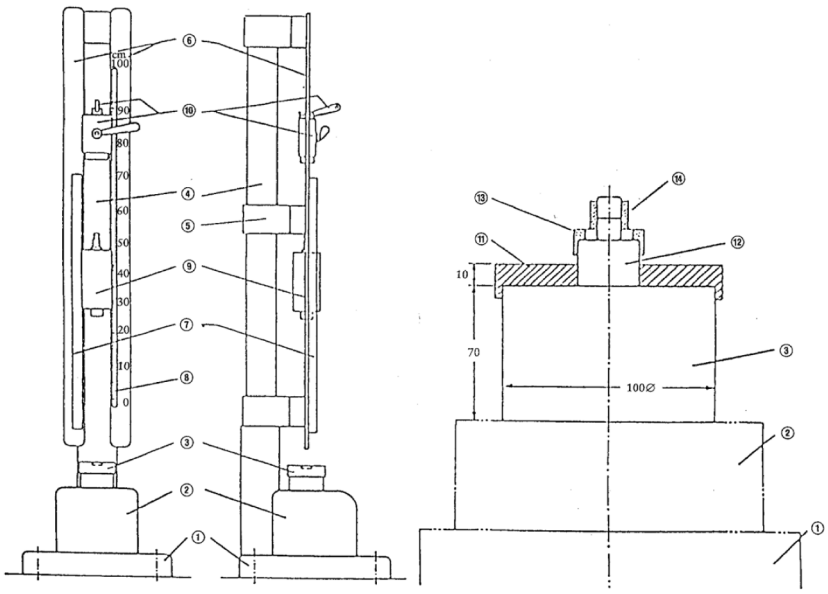
Temperatūras/laika grafiks, kas iegūts, sildot dibutilftalātu (27 cm^3) slēgtā caurulē (atveres izmērs 1,5 mm), izmantojot propāna plūsmas ātrumu 3,2 l/min. Temperatūru mēra ar 1 mm diametra hromela/alumela termopāri tērauda apvalkā, kas novietots centrā 43 mm zem caurules atloka. Sildīšanas ātrumam no 135 °C līdz 285 °C ir jābūt no 185 līdz 215 K/min.

▼B

4. attēls

Trieciena testa aparāts

(visi izmēri norādīti milimetros)



4.a att. Krītošais āmurs, priekšskats un sānskats, kopskats

(1) pamatne, 450 x 450 x 60
(2) tērauda bloks, 230 x 250 x 200
(3) lakta, 100 diam. x 70
(4) statnis
(5) vidējais šķērsis
(6) 2 vadotnes
(7) zobstienis

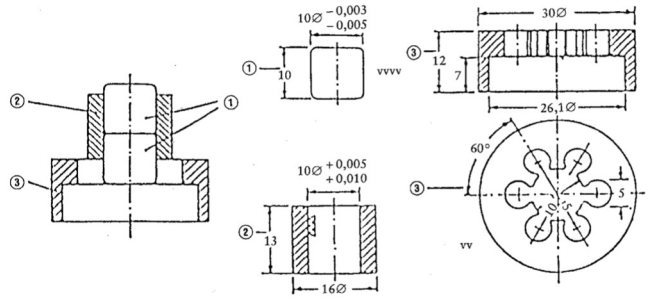
4.b att. Krītošais āmurs, apakšdaļa

(8) graduēta skala
(9) krītošais āmurs (krītošā masa)
(10) turēšanas un palaišanas ierīce
(11) pozicionēšanas plate
(12) starplakta (maināma) 26 diam. x 26
(13) pozicionēšanas gredzens ar atverēm
(14) triecienierīce

▼B

4. attēls

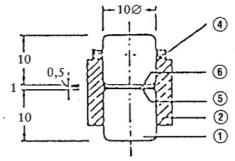
(turpinājums)

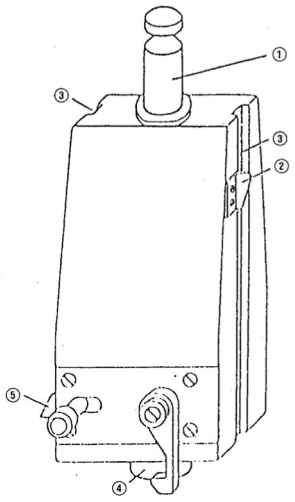


4.c att. Triecienierīce pulverveida vai pastveida vielu testēšanai

(1) tērauda cilindri
(2) tērauda cilindru vadotne
(3) pozicionēšanas gredzens ar atverēm
(a) šķērsgriezums
(b) augšskats
(4) gumijas gredzens
(5) šķidra viela (40 mm^3)
(6) no šķidruma brīva telpa

4.d att. Triecienierīce šķidru vielu testēšanai





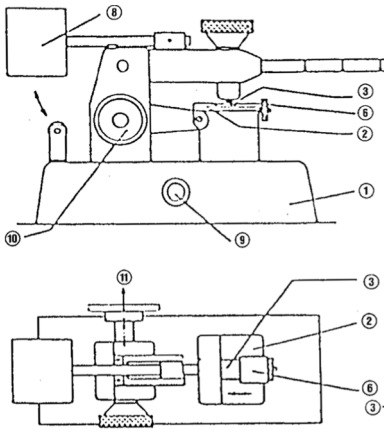
4.e att. Āmurs (masa 5 kg)

(1) piekārtais ieliktnis
(2) augstuma atzīme
(3) pozicionēšanas rieva
(4) cilindrisks belznis
(5) atsitiena uztvērējs

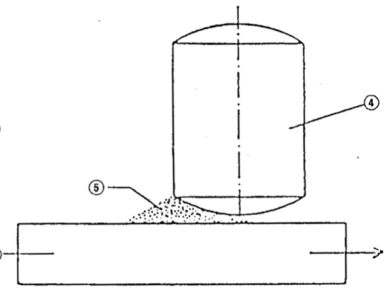
▼B

5. attēls

Berzes jutības testēšanas iekārta



5.a att. Berzes aparāts; pretskats un augšskats



5.b att. Kājas sākumstāvoklis uz plates

(1) tērauda pamatne
(2) kustīgs rāmis
(3) porcelāna plate, 25 x 25 x 5 mm, nostiprināta uz rāmja
(4) nekustīga porcelāna kāja, 10 diam. x 15 mm
(5) testējamais paraugs, apm. 10 mm^3
(6) kājas turētājs
(7) slodzes svira
(8) pretsvars
(9) slēdzis
(10) rokturis rāmja iestatīšanai sākumstāvoklī
(11) elektromotora griešanās virziens

▼B

A.15. **PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRA (ŠĶIDRUMI UN GĀZES)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šai pārbaudei pakļauj sprādzienbīstamas vielas un vielas, kas saskarē ar gaisu spontāni aizdegas apkārtējā temperatūrā. Testēšanas procedūra izmantojama gāzēm, šķidrumiem un tvaikiem, kuri gaisa klātbūtnē var aizdegties no karstas virsmas.

Pašaizdegšanās temperatūra var ievērojami pazemināties katalītisku piemaisījumu klātbūtnē, no virsmas materiāla vai palielinot testēšanas trauka tilpumu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Pašaizdegšanās spēju raksturo ar pašaizdegšanās temperatūru. Pašaizdegšanās temperatūra ir zemākā temperatūra, kurā testējamā viela aizdegas, kad to sajauc ar gaisu, ievērojot pārbaudes metodē paredzētos apstākļus.

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas norādītas attiecīgajos standartos (skatīt 1.6.3. punktu). Tās galvenokārt izmanto metodes izpildījuma periodiskām pārbaudēm un dažādu metožu salīdzināšanai.

1.4. METODES PRINCIPS

Pēc šīs metodes nosaka kameras iekšējās virsmas minimālo temperatūru, kurā notiek kamerā ievadītās gāzes, tvaika vai šķidruma aizdegšanās.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Atkārtojamība ir atkarīga no pašaizdegšanās temperatūras intervāla un izmantotās noteikšanas metodes.

Jutība un specifiskums ir atkarīgi no izmantotās metodes.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Šī iekārta ir aplūkota 1.6.3. punktā minētās metodes aprakstā.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Vielas paraugu pārbauda pēc metodes, kas minēta 1.6.3. punktā.

1.6.3. **Pārbaudes norise**

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

▼B

2. **DATI**

Reģistrē temperatūru pārbaudes laikā, atmosfēras spiedienu, izmantotā parauga lielumu, laika sprīdi līdz aizdegšanās brīdim.

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— precīzs vielas apraksts (raksturojums un piemaisījumi),

— izmantotā parauga lielums, atmosfēras spiediens,

— izmantotā iekārta,

— mērījumu rezultāti (temperatūra pārbaudes laikā, rezultāti, kas raksturo aizdegšanos, laika sprīdis līdz aizdegšanās brīdim),

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Nav.

▼B

A.16. **RELATĪVĀS PAŠAIZDEGŠANĀS TEMPERATŪRAS NOTEIKŠANA CIETVIELĀM**

1. **METODE**

1.1 IEVADS

Šai pārbaudei pakļauj sprādzienbīstamas vielas un vielas, kas saskarē ar gaisu spontāni aizdegas apkārtējā temperatūrā.

Šīs pārbaudes mērķis ir iegūt orientējošu informāciju par cietu vielu pašaizdegšanos paaugstinātā temperatūrā.

Ja siltumu, kas rodas, vielai reaģējot ar skābekli vai tai eksotermiski sadaloties, pietiekami ātri neuzņem apkārtējā vide, pašsasilšana izraisa pašaizdegšanos. Tāpēc pašaizdegšanās notiek tad, ja siltuma rašanās ātrums pārsniedz siltuma izkliedēšanās ātrumu.

Šī metode ir noderīga, veicot cietu vielu orientējošu testēšanu. Ņemot vērā cietu vielu aizdegšanās un degšanas procesa sarežģīto raksturu, pašaizdegšanās temperatūra, ko nosaka ar šo metodi, ir izmantojama tikai salīdzināšanai.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Pašaizdegšanās temperatūra, ko nosaka ar šo metodi, ir viszemākā apkārtējā temperatūra (^{o}C), kurā aizdegas konkrēts vielas daudzums, kas pakļauts iepriekš noteiktiem apstākļiem.

1.3. STANDARTVIELA

Nav.

1.4. METODES PRINCIPS

Noteiktu daudzumu testējamās vielas ievieto krāsnī istabas temperatūrā; parauga centrā uzņem temperatūras izmaiņu līkni atkarībā no laika, līdz krāsns temperatūra sasniedz 400 ^{o}C, vai līdz kušanas temperatūrai, ja tā ir zemāka, sildot ar ātrumu 0,5 ^{o}C/min. Šajā testā par pašaizdegšanās temperatūru uzskata krāsns temperatūru, kurā parauga temperatūra sasniedz 400 ^{o}C pašsakaršanas dēļ.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

1.6.1.1. *Krāsns*

Laboratorijas krāsns ar programmējamu temperatūru (tilpums ap 2 l) ir aprīkota ar gaisa apmaiņas sistēmu un preteksplozijas vārstu. Lai novērstu iespējamo sprādzienu, vielas sadalīšanās procesā radušās gāzes nedrīkst nonākt kontaktā ar sildelementiem.

▼B

1.6.1.2. *Stiepļu pinuma kubs*

Nerūsējoša tērauda stiepļu pinuma sietu ar acu izmēru 0,045 mm sagriež pēc 1. attēlā dotā parauga. Sietu saloka un nostiprina ar stiepli, izveidojot kubu ar vaļēju augšdaļu.

1.6.1.3. *Termopāri*

Piemēroti termopāri.

1.6.1.4. *Pašrakstītājs*

Der jebkurš divkanālu pašrakstītājs, kas kalibrēts 0–600 °C temperatūrai vai attiecīgajam spriegumam.

1.6.2. **Pārbaudes apstākļi**

Vielas testē veidā, kādā tās saņem.

1.6.3. **Pārbaudes norise**

Kubā iepilda pārbaudāmo vielu un pēc vieglas sakratīšanas to papildina, kamēr kubs ir pilns līdz augšai. Paraugu iekar krāsns vidū istabas temperatūrā. Vienu termoelementu novieto krāsns vidū un otru – krāsns temperatūras reģistrēšanai – starp kubu un krāsns sienu.

Kamēr krāsns temperatūra pieaug ar ātrumu 0,5 °C/min līdz 400 °C vai līdz cietās vielas kušanas temperatūrai, nepārtraukti reģistrē krāsns un parauga temperatūru.

Vielai aizdegoties, parauga termoelements uzrāda ļoti strauju temperatūras pieaugumu virs krāsns temperatūras.

2. **DATI**

Novērtējumam izmanto krāsns temperatūru, kurā paraugs ir sasniedzis 400 °C pašsakaršanas rezultātā (skatīt 2. attēlu).

3. **PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— pārbaudāmās vielas apraksts,

— mērījumu rezultāti kopā ar temperatūras līkni,

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

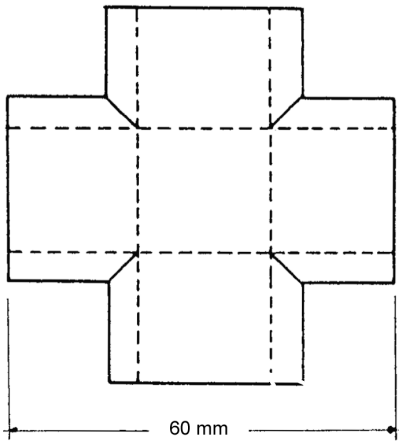
4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

▼B

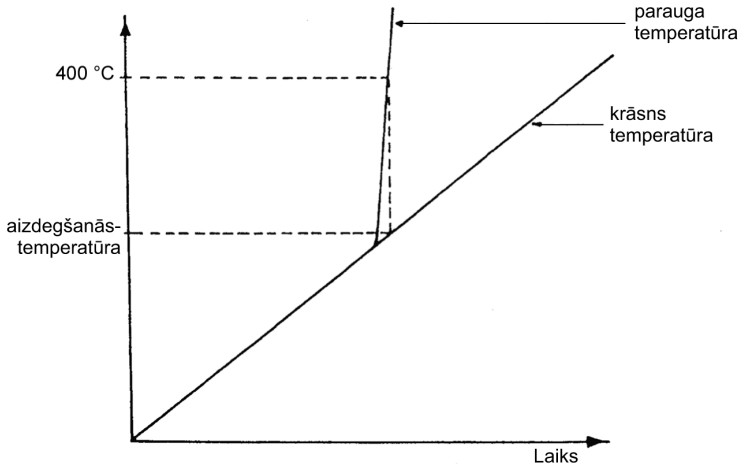
1. attēls

Pārbaudē izmantojamā 20 mm kuba piegrieztne



2. attēls

Raksturīga temperatūras līkne



▼B

A.17. **OKSIDĒJOŠĀS ĪPAŠĪBAS (CIETVIELAS)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pirms šīs pārbaudes veikšanas ir lietderīgi jau iepriekš iegūt informāciju par pārbaudāmās vielas iespējamo sprādzienbīstamību.

Šī metode nav izmantojama šķidrumiem, gāzēm, sprādzienbīstamām vai viegli uzliesmojošām vielām un organiskajiem peroksīdiem.

Šis tests nav jāveic gadījumos, kad vielas struktūrformula nepārprotami liecina, ka viela nevar stāties eksotermiskās reakcijās ar viegli uzliesmojošiem materiāliem.

Lai noskaidrotu, vai pārbaudes gaitā būtu jāievēro īpaša piesardzība, ir jāveic orientējoši izmēģinājumi.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Degšanas ilgums ir reakcijas ilgums sekundēs, kurā reakcijas zona aptver visu paraugu saskaņā ar 1.6. punktā aprakstīto metodi.

Degšanas ātrums: izteikts milimetros sekundē.

Maksimālais degšanas ātrums: lielākais degšanas ātrums, kas noteikts maisījumiem, kuros ir 10 līdz 90 masas % oksidētāja.

1.3. STANDARTVIELA

Testēšanai un orientējošiem izmēģinājumiem par standartvielu izmanto analītiski tīru bārija nitrātu.

Par standartmaisījumu izmanto bārija nitrāta (parasti izmanto 60 masas % bārija nitrāta) maisījumu ar celulozes pulveri, kas pagatavots, kā norādīts 1.6. punktā, un kam piemīt maksimālais degšanas ātrums.

1.4. METODES PRINCIPS

Orientējošu izmēģinājumu veic drošības apsvērumu dēļ. Papildu testēšana nav jāveic gadījumos, kad orientējošos izmēģinājumos skaidri redzams, ka vielai ir oksidētāja īpašības. Ja tā nenotiek, testēšanu veic pēc pilnas programmas.

Šajā gadījumā pārbaudāmo vielu sajauc ar labi zināmu ugunsnedrošu vielu dažādās attiecībās. Pēc tam no katra maisījuma izveido valnīti un no viena gala to aizdedzina. Iegūto maksimālo degšanas ātrumu salīdzina ar standartmaisījuma maksimālo degšanas ātrumu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Vajadzības gadījumā var izmantot jebkuru smalcināšanas un sajaukšanas paņēmienu, lai panāktu, ka maksimālais degšanas ātrums sešās atsevišķās pārbaudēs neatšķiras no aritmētiskā vidējā vairāk par 10 %.

▼B

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošana**

1.6.1.1. *Pārbaudāmā viela*

Samazina pārbaudāmā parauga daļiņu lielumu līdz < 0,125 mm, kā tas norādīts tālāk: vielu sijā un rupjo frakciju sasmalcina, šo procedūru atkārto, līdz viss testējamais vielas daudzums iziet caur sietu.

Var izmantot jebkuru smalcināšanas un sijāšanas paņēmienu, kas atbilst kvalitātes kritērijiem.

Pirms maisījuma pagatavošanas vielu žāvē 105 °C temperatūrā, līdz tās svars kļūst nemainīgs. Ja pārbaudāmās vielas sadalīšanās temperatūra ir zemāka par 105 °C, tā attiecīgi jāžāvē zemākā temperatūrā.

1.6.1.2. *Ugunsnedrošā viela*

Kā ugunsnedrošo vielu izmanto celulozes pulveri. Šim nolūkam der celuloze, kas paredzēta izmantošanai plānslāņa hromatogrāfijā vai kolonnu hromatogrāfijā. Kā rāda pieredze, tā var būt celuloze, kurai 85 % šķiedru ir garumā no 0,020 līdz 0,075 mm. Celulozes pulveri izsijā caur sietu ar acu izmēru 0,125 mm. Visai testēšanai jāizmanto celulozes no vienas un tās pašas partijas.

Pirms maisījuma pagatavošanas celulozes pulveri žāvē 105 °C temperatūrā, līdz tās svars kļūst nemainīgs.

Ja orientējošam izmēģinājumam izmanto koksnes putekļus, ņem skujkoku koksnes putekļus, kas izsijāti caur sietu ar acu lielumu 1,6 mm, rūpīgi tās samaisa un tad žāvē četras stundas 105 °C temperatūrā, izklājot tās 25 mm biezā kārtā. Pēc atdzesēšanas tās līdz izmantošanas brīdim (vēlams 24 stundu laikā pēc žāvēšanas) glabā hermētiskā tvertnē, ko piepilda iespējami pilnu.

1.6.1.3. *Aizdegšanās avots*

Par uguns avotu izmanto gāzes degļa karstu liesmu (minimālais diametrs – 5 mm). Ja izmanto citu uguns avotu (piemēram, veicot testēšanu inertā atmosfērā), tas attiecīgi jāapraksta un jāpamato.

1.6.2. **Pārbaudes norise**

Piezīme

Oksidētāju maisījumi ar celulozi vai koksnes putekļiem ir sprādzienbīstami, tāpēc ir jāievēro piesardzības pasākumi.

1.6.2.1. *Orientējošs izmēģinājums*

Izžāvēto vielu sajauc ar sausu celulozi vai koksnes putekļiem, lai pārbaudāmās vielas un celulozes vai koksnes putekļu masas attiecība būtu 2:1, un, iepildot koniskas formas traukā, (piemēram, stikla piltuvē ar aizbāztu kātu) no maisījuma nepieblīvējot izveido nelielu konisku kaudzīti, kuras izmēri ir 3,5 cm (apakšējais diametrs) × 2,5 cm (augstums).

▼B

Kaudzīti novieto uz vēsas nedegoša materiāla plātnes ar zemu siltumvadītspēju. Pārbaudi veic velkmes skapī, kā norādīts 1.6.2.2. punktā.

Ar uguns avotu pieskaras konusam. Novēro un reģistrē notiekošās reakcijas intensitāti un ilgumu.

Ja reakcija noris spēji, uzskata, ka vielai ir oksidētāja īpašības.

Ja rezultāti vieš šaubas, katrreiz jāveic pilna pārbaude, kā tas norādīts tālāk.

1.6.2.2. *Sliedes tests*

Sagatavo oksidētāja/celulozes maisījumus, kas satur no 10 līdz 90 masas % oksidētāja, ar 10 % palielinājumu. Strīdīgos gadījumos izmanto oksidētāja/celulozes maisījumus ar mazāku palielinājumu, lai precīzāk noteiktu maksimālo degšanas ātrumu.

No pārbaudāmās vielas ar veidnes palīdzību izveido valnīti. Veidne ir izgatavota no metāla, tās garums ir 250 mm un trijstūra šķērsgriezumu ar augstumu iekšpusē 10 mm, bet platumu iekšpusē – 20 mm. Veidnes abās pusēs garenvirzienā sānu norobežošanai piestiprina divas metāla plāksnes, kuras izvirzītas 2 mm virs trijstūra šķērsgriezuma (skatīt attēlu). To nesablīvējot piepilda ar maisījumu nelielā pārākumā. Pēc veidnes kritiena uz cietas virsmas no 2 cm augstuma lieko vielu noņem ar slīpi novietotu skārda sloksni. Tad noņem norobežotājplāksnes un atlikušo pulveri izlīdzina ar veltni. Veidnei uzliek pamatplati no nedegoša materiāla bez porām un zemu siltuma vadītspēju, apgriež otrādi un veidni noņem.

Pārbaudāmās vielas valnīti ievieto velkmes skapī perpendikulāri gaisa plūsmai.

Gaisa plūsmas ātrumam jābūt pietiekami lielam, lai dūmi neiekļūtu laboratorijā, un to nedrīkst mainīt pārbaudes gaitā. Ap iekārtu jānovieto ekrāns, kas to aizsargā no gaisa plūsmas.

Ņemot vērā celulozes un pārbaudāmo vielu higroskopiskumu, pārbaude jāveic cik iespējams ātri.

Valnīti no viena gala aizdedzina, pieskaroties ar liesmu.

Reakcijas ilgumu reģistrē 200 mm posmā pēc tam, kad reakcijas zona ir aptvērusi pirmos 30 mm.

Testēšanu veic, izmantojot standartvielu un vismaz vienreiz ar katru no testējamās vielas maisījumiem ar celulozi.

Ja tiek konstatēts, ka maksimālais degšanas ātrums ir ievērojami lielāks par standartvielas degšanas ātrumu, testēšanu var neturpināt; citādi izmēģinājums ar trijiem maisījumiem, kuriem ir lielākais degšanas ātrums, ir jāatkārto piecas reizes.

▼B

Ja ir aizdomas, ka iegūtais rezultāts ir šķietami pozitīvs, tests jāatkārto ar inertu vielu celulozes vietā, kurai ir līdzīgs daļiņu izmērs, piemēram, ar kizelgūru. Otra iespēja ir inertā atmosfērā (< 2 % v/v skābekļa) atkārtoti testēt to testējamās vielas/celulozes maisījumu, kuram ir lielākais degšanas ātrums.

2. **DATI**

Drošības apsvērumu dēļ uzskata, ka pārbaudāmās vielas oksidējošās īpašības raksturo maksimālais degšanas ātrums, nevis tā vidējā vērtība.

Novērtēšanai pietiek ar maksimālo degšanas ātrumu, kas noteikts sešu pārbaužu sērijā ar vienu izvēlēto maisījumu.

Katram maisījumam konstruē maksimālā degšanas ātruma grafiku atkarībā no oksidētāja koncentrācijas tajā. Pēc šā grafika nosaka maksimālo degšanas ātrumu.

Izmēģinājumu sērijā noteiktās sešas noteiktās degšanas ātruma vērtības maisījumam ar maksimālo degšanas ātrumu nedrīkst atšķirties vairāk par 10 % no to vidējās aritmētiskās vērtības; citādi jāpilnveido sasmalcināšanas un maisījumu sagatavošanas metodes.

Iegūto maksimālo degšanas ātrumu salīdzina ar standartmaisījuma maksimālo degšanas ātrumu (skatīt 1.3. punktu).

Ja testēšanu veic inertā atmosfērā, maksimālo reakcijas ātrumu salīdzina ar standartvielas maksimālo reakcijas ātrumu inertā atmosfērā.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— testējamās vielas identifikācija, sastāvs, tīrība, mitruma saturs u. c.,

— analizējamā parauga sagatavošana (piemēram, smalcināšana, žāvēšana u. tml.),

— izmēģinājumos izmantotais uguns avots,

— mērījumu rezultāti,

— reakcijas gaita (piemēram, virsējās kārtas uzliesmošana, visa parauga degšana, jebkuri dati par sadegšanas produktiem u. tml.),

— jebkuras papildu piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, tostarp dati par pārbaudāmās vielas un standartvielas reakcijas intensitāti (uzliesmošana, dzirksteļošana, dūmu rašanās, lēna gruzdēšana utt.) un aptuveno ilgumu, kas gūti sākotnējā drošības pārbaudē vai orientējošā izmēģinājumā,

— testēšanas rezultāti ar inertu vielu, ja tie veikti,

— testēšanas rezultāti inertā atmosfērā, ja tie veikti.

▼B

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Uzskata, ka vielai piemīt oksidējošas īpašības, ja:

a) orientējošā izmēģinājumā tā izraisa intensīvu reakciju;

b) analizējamo maisījumu maksimālais degšanas ātrums pārbaudes laikā pārsniedz vai ir vienāds ar standartmaisījuma (celuloze un bārija nitrāts) maksimālo degšanas ātrumu.

Lai neiegūtu šķietami pozitīvu rezultātu, rezultātus interpretējot, ņem vērā rezultātus, kuri iegūti, testējamo vielu sajaucot ar inertu materiālu un/vai veicot testēšanu inertā atmosfērā.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

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

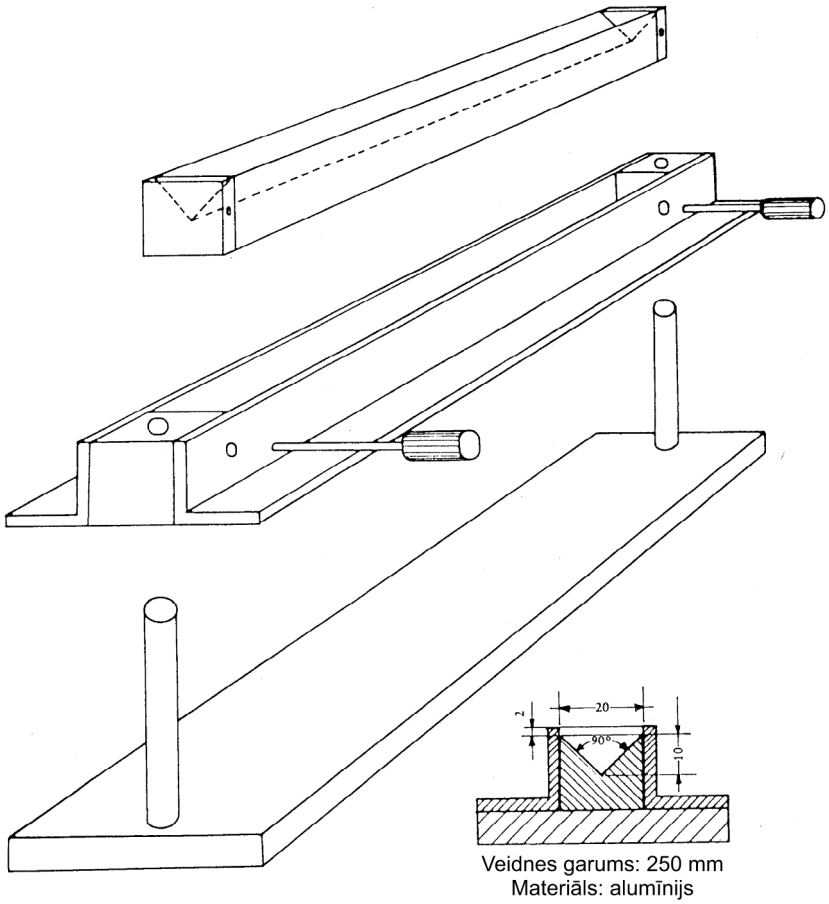
▼B

Papildinājums

Attēls

Veidne un papildu aprīkojums degšanas ilguma noteikšanai

(visi izmēri norādīti milimetros)



Veidnes garums: 250 mm
Materiāls: alumīnijs

▼B

A.18. **POLIMĒRU VIDĒJĀ MOLEKULAS MASA UN MOLEKULAS MASU SADALĪJUMS**

1. **METODE**

Šī gelhromatogrāfijas metode ir *OECD* (Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācija) TG 118 (1996) kopija. Pamatprincipi un tehniskā informācija ir izmantotās literatūras sarakstā (1).

1.1. IEVADS

Tā kā polimēru īpašības ir tik dažādas, nav iespējams aprakstīt vienu atsevišķu metodi, kas precīzi izklāstītu sadalīšanas un novērtēšanas apstākļus, kuri aptvertu visus gadījumus un specifiskās īpatnības, kuras sastopamas polimēru sadalīšanā. Īpaši sarežģītas polimēru sistēmas bieži nepakļaujas gelhromatogrāfijai (*GPC – Gel permeation chromatography*). Ja *GPC* nevar izmantot, molekulas masu var noteikt ar citām metodēm (skatīt pielikumu). Tādos gadījumos būtu jādod visa informācija par lietoto metodi un pamatojums.

Aprakstītās metodes pamatā ir *DIN (Deutsches Institut fur Normung – Vācijas valsts standartu institūts)* standarts 55672 (1). Detalizētu informāciju par to, kā veikt eksperimentus un novērtēt datus, var atrast šajā *DIN* standartā. Ja eksperimenta apstākļi jāmodificē, šīs izmaiņas jāpamato. Citus standartus var izmantot, ja uz tiem dod pilnīgi visas atsauces. Šī metode apraksta polistirola paraugu ar zināmu polidispersiju izmantošanu kalibrēšanai, un tā varbūt jāmodificē, lai būtu piemērota noteiktiem polimēriem, piemēram, ūdenī šķīstošiem un sazarotiem polimēriem ar garām ķēdītēm.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Skaitlisko vidējo molekulas masu M_n un masas vidējo molekulas masu M_w nosaka, izmantojot šādus vienādojumus:

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

kur:

H_i = detektora signāla līmenis no bāzes līnijas aizturēšanas tilpumam V_i,

M_i = molekulas masa polimēra frakcijai pie aizturēšanas tilpuma V_i,

n = datu punktu skaits.

Molekulu masu sadalījuma platumu, kas ir sistēmas dispersijas pakāpes mērs, nosaka attiecība M_w/M_n.

▼B

1.3. STANDARTVIELAS

Tā kā *GPC* ir relatīva metode, jāveic kalibrēšana. Šim nolūkam parasti izmanto lineārus polistirola standartus ar šauru sadalījuma diapazonu, zināmām vidējām molekulas masām M_n un M_w un zināmu molekulu masu sadalījumu. Kalibrēšanas līkni, nosakot nezināma parauga molekulas masu, var izmantot tikai tad, ja parauga un standarta sadalīšanas apstākļi ir izvēlēti identiski.

Noteiktā attiecība starp molekulas masu un eluēšanas tilpumu ir ticama tikai konkrēta eksperimenta specifiskos apstākļos. Apstākļi vispirms ietver temperatūru, šķīdinātāju (vai šķīdinātāju maisījumu), hromatografēšanas apstākļus un sadalīšanas kolonnu vai kolonnu sistēmu.

Šādi noteikto molekulas masu lielumi ir relatīvi, un tos apzīmē kā "polistirola ekvivalenta molekulas masas". Tas nozīmē, ka atkarībā no uzbūves un ķīmiskām atšķirībām starp paraugu un standartu molekulu masas var lielākā vai mazākā mērā atšķirties no absolūtās vērtības. Ja lieto citus standartus, piemēram, polietilenglikolu, polietilenoksīdu, polimetilmetakrilātu, poliakrilskābi, tas būtu jāpamato.

1.4. PĀRBAUDES METODES PRINCIPS

Izmantojot *GPC* metodi, var noteikt gan molekulu masu sadalījumu, gan vidējās molekulu masas (M_n un M_w). *GPC* ir īpaša veida šķidruma hromatogrāfija, kur paraugu sadala atbilstoši atsevišķo sastāvdaļu hidrodinamiskiem tilpumiem (2).

Sadalīšana notiek, paraugam izejot caur kolonnu, kas ir pildīta ar porainu materiālu, parasti ar organisku gelu. Mazas molekulas var iespiesties porās, bet lielas molekulas nevar. Lielo molekulu ceļš tādēļ ir īsāks, un tās pirmās tiek eluētas. Vidēji lielas molekulas iekļūst dažās no porām, tādēļ tiek eluētas vēlāk. Mazākās molekulas, kuru hidrodinamiskais rādiuss ir mazāks nekā gela poras, var iekļūt visās porās. Tās tiek eluētas visvēlāk.

Ideālā situācijā sadalīšanu pilnībā nosaka molekulu lielums, bet praksē ir grūti izvairīties vismaz no dažiem absorbcijas radītiem traucējumiem. Nevienāds kolonnas pildījums un kolonnā nesorbēto vielu aiztures laiks stāvokli var padarīt vēl sliktāku (2).

Noteikšanu veic, piemēram, izmantojot laušanas koeficientu vai UV absorbciju, un iegūst vienkāršu sadalījuma līkni. Tomēr, lai faktiskās molekulas masas vērtības attiecinātu uz līkni, jākalibrē kolonna, izlaižot cauri polimērus ar zināmu molekulas masu un ideālā variantā ar aptuveni līdzīgu uzbūvi, piemēram, dažādas polistirola standartvielas. Parasti iegūst Gausa sadalījuma līkni, dažkārt deformētu ar nelielu asti mazo molekulu masu pusē; uz šī grafika vertikālās ass ir eluēto vielu, kam ir dažāda molekulas masa, svara daudzumi, un uz horizontālās ass ir molekulas masas logaritms.

▼B

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Eluēšanas tilpuma atkārtojamībai (relatīvā standarta novirze – *Relative Standart Deviation: RSD*) būtu jābūt labākai par 0,3 %. Analīzes vajadzīgā atkārtojamība jānodrošina ar korekciju, izmantojot iekšējo standartu, ja hromatogramma ir izrādījusies atkarīga no laika un neatbilst iepriekšminētajam kritērijam (1). Polidispersitāte ir atkarīga no standartu molekulu masām. Polistirola standartiem parastās vērtības ir:

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

(M_p ir standartvielas molekulas masa pīķa maksimuma punktā.)

1.6. PĀRBAUDES METODES APRAKSTS

1.6.1. **Polistirola standartšķīduma pagatavošana**

Polistirola standartus, rūpīgi maisot, izšķīdina izvēlētajā eluentā. Šķīdumus pagatavojot, jāievēro ražotāja instrukcijas.

Izvēlētās standartšķīdumu koncentrācijas ir atkarīgas no dažādiem faktoriem, piemēram, iešļircināmā tilpuma, šķīduma viskozitātes un jutības pret analīzes detektoru. Maksimālais iešļircināmais tilpums jāpieskaņo kolonnas garumam, lai izvairītos no pārslodzes. Parasti analītiskām sadalīšanām, izmantojot *GPC* ar kolonnas izmēriem 30 cm × 7,8 mm, iešļircināmie tilpumi ir starp 40 un 100 µl. Ir iespējams izmantot lielākus tilpumus, bet tiem nevajadzētu pārsniegt 250 µl. Pirms kolonnas faktiskās kalibrēšanas jānosaka optimālā attiecība starp iešļircināmo tilpumu un koncentrāciju.

1.6.2. **Parauga šķīduma pagatavošana**

Principā parauga pagatavošanai ir tādas pašas prasības. Paraugu, uzmanīgi kratot, izšķīdina piemērotā šķīdinātājā, piemēram, tetrahidrofurānā (THF). Nekādā ziņā šķīdināt nedrīkst, izmantojot ultraskaņas vannu. Ja vajag, parauga šķīdumu tīra, filtrējot caur membrānas filtru ar poru diametru starp 0,2 un 2 µm.

Neizšķīdušu daļiņu klātiene jāatzīmē beigu protokolā, jo tās var rasties no augstmolekulārām vielām. Jālieto piemērota metode, lai noteiktu izšķīdušo daļiņu svara procentu. Šķīdums jāizlieto 24 stundu laikā.

1.6.3. **Aparatūra**

— Šķīdinātāja rezervuārs,

— atgāzētājs (ja vajadzīgs),

— sūknis,

▼B

— impulsu dempferis (ja vajadzīgs),

— iešļircināšanas sistēma,

— hromatogrāfiskā kolonna,

— detektors,

— plūsmas mērītājs (ja vajadzīgs),

— datu reģistrēšanas-apstrādes iekārta,

— trauks atkritumiem.

Jānodrošina, lai *GPC* sistēma būtu inerta pret lietojamiem šķīdinātājiem (piemēram, izmantojot tērauda kapilārus THF šķīdinātājam).

1.6.4. **Iešļircināšanas un šķīdinātāja padeves sistēma**

Parauga šķīduma noteiktu tilpumu ievada kolonnā vai nu ar autosampleru, vai ar roku precīzi noteiktā zonā. Pārāk ātra šļirces virzuļa atvilkšana vai nospiešana ar roku var radīt konstatētā molekulas masu sadalījuma maiņas. Šķīdinātāja padeves sistēmai, ciktāl tas ir iespējams, būtu jādarbojas bez impulsiem, tādēļ ideālā variantā sistēmā būtu jāiemontē impulsu dempferis. Plūsmas ātruma kārtas lielums ir 1 ml/min.

1.6.5. **Kolonna**

Atkarībā no parauga polimēru analizē, izmantojot vai nu vienu kolonnu, vai vairākas secīgas kolonnas. Tirdzniecībā ir pieejami vairāki kolonnu materiāli ar noteiktām īpašībām (piemēram, poru lielumu, molekulas izmēru robežām). Sadalīšanas gela vai kolonnas garuma izvēle ir atkarīga no parauga īpašībām (hidrodinamiskie tilpumi, molekulu masu sadalījums) un sadalīšanas specifiskiem apstākļiem, piemēram, šķīdinātāja, temperatūras un plūsmas ātruma (1) (2) (3).

1.6.6. **Teorētiskie šķīvji**

Sadalīšanai lietojamā kolonna vai kolonnu apvienojums jāraksturo ar teorētisko šķīvju skaitu. Tas ietver, ja par eluēšanas šķīdinātāju lieto THF, etilbenzola vai cita piemērota nepolāra šķīdinātāja ievadīšanu noteikta garuma kolonnā. Teorētisko šķīvju skaitu aprēķina ar šādu vienādojumu:

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

kur:

N = teorētisko šķīvju skaits,

V_e = eluēšanas tilpums pīķa maksimumā,

▼B

W = pīķa platums pie bāzes līnijas,

$W_{1/2}$ = pīķa platums pusē no tā augstuma.

1.6.7. **Sadalīšanas efektivitāte**

Bez teorētisko šķīvju skaita, kas nosaka pīķa platumu, nozīme ir arī sadalīšanas efektivitātei, ko nosaka kalibrācijas līknes stāvums. Kolonnas sadalīšanas efektivitāti var aprēķināt no šādas sakarības:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kur:

$V_{e,\ Mx}$ = eluēšanas tilpums polistirolam ar molekulas masu M_x,

$V_{e,(10M)}$ = eluēšanas tilpums polistirolam ar 10 reižu lielāku molekulas masu,

L = kolonnas šķērsgriezuma laukums.

Sistēmas izšķirtspēju parasti definē šādi:

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

kur:

V_{e1}, V_{e2} = divu polistirola standartu eluēšanas tilpumi pīķa maksimuma punktā,

W_1, W_2 = pīķa platums pie bāzes līnijas,

M_1, M_2 = molekulas masas pīķa maksimumā (tām būtu jāatšķiras 10 reižu).

Kolonnas sistēmai R vērtībai būtu jābūt lielākai par 1,7 (4).

1.6.8. **Šķīdinātāji**

Visiem šķīdinātājiem jābūt augstas tīrības pakāpes (THF izmanto ar tīrības pakāpi 99,5 %). Šķīdinātāja rezervuāram (ja vajadzīgs, inertas gāzes atmosfērā) jābūt pietiekami lielam, lai veiktu kolonnas kalibrēšanu un vairākas paraugu analīzes. Pirms šķīdinātāju ievada kolonnā ar sūkni, tam jābūt atbrīvotam no gāzēm.

1.6.9. **Temperatūras kontrole**

Galveno iekšējo sastāvdaļu (inžektora cilpa, kolonnas, detektors un caurules) temperatūrai jābūt konstantai un jāatbilst izvēlētajam šķīdinātājam.

▼B

1.6.10. **Detektors**

Detektora uzdevums ir kvantitatīvi reģistrēt parauga, kas eluējas no kolonnas, koncentrāciju. Lai izvairītos no nevēlamas pīķu paplašināšanās, detektora šūnas ķivetes tilpumam jābūt tik mazam, cik iespējams. Tam nevajadzētu būt lielākam par 10 µl, izņemot gaismas izkliedes un viskozitātes detektorus. Detektēšanai parasti izmanto diferenciālo refraktometriju. Tomēr, ja to prasa specifiskas parauga vai eluēšanas šķīdinātāja īpašības, var izmantot citu veidu detektorus, piemēram, UV/VIS, IR, viskozitātes detektorus utt.

2. **DATI UN PROTOKOLI**

2.1. DATI

Par detalizētiem novērtēšanas kritērijiem un prasībām, kas attiecas uz datu savākšanu un apstrādi, skatīt DIN standartu (1).

Katram paraugam jāizdara divi neatkarīgi eksperimenti. Tie jāanalizē atsevišķi.

M_n, M_w, M_w/M_n un M_p jāsniedz katram mērījumam. Skaidri jānorāda, ka izmērītie lielumi ir relatīvi lielumi, kas ir ekvivalenti izmantoto standartvielu molekulu masām.

Pēc aiztures tilpumu vai aiztures laiku noteikšanas (ja iespējams, koriģējot ar iekšējo standartu) uz grafika atliek log M_p (M_p ir kalibrēšanas standarta pīķa maksimums) pret vienu no šiem abiem lielumiem. Uz molekulu masu dekādi ir vajadzīgi vismaz divi kalibrēšanas punkti, un visai kalibrēšanas līknei vajadzīgi vismaz pieci punkti, šai līknei jāietver noteiktā parauga molekulas masa. Kalibrēšanas līknes mazo molekulu masu galapunktu nosaka ar n-heksilbenzolu vai citu piemērotu izšķīdināto vielu. Skaita vidējo vai svara vidējo molekulas masu parasti nosaka, izmantojot elektronisko datu apstrādi, kas pamatojas uz formulām, kas dotas 1.2. sadaļā. Ja datus apstrādā ar roku, var izmantot ASTM D 3536-91 (3).

Sadalījuma līkne jāsagatavo tabulas veidā vai līknes veidā (kā diferenciālas frekvences vai procentu no summas attiecība pret log M). Grafiskajā attēlā vienai molekulu masu dekādei parasti būtu jābūt ap 4 cm platai un pīķa maksimumam jābūt ap 8 cm augstam. Integrālai sadalījuma līknei starpībai starp 0 un 100 % uz ordinātas būtu jābūt ap 10 cm.

2.2. PĀRBAUDES PROTOKOLS

Pārbaudes protokolā jābūt šādai informācijai:

2.2.1. **Pārbaudāmā viela**

— Par pārbaudāmo vielu pieejamā informācija (identiskums, piedevas, piemaisījumi),

▼B

— parauga apstrādes apraksts, novērojumi, problēmas.

2.2.2. **Iekārtas**

— Eluenta rezervuārs, inerta gāze, eluenta atgāzēšana, eluenta sastāvs, piemaisījumi,

— sūknis, impulsu dempferis, iešļircināšanas sistēma,

— sadalīšanas kolonnas (ražotājs, visa informācija par kolonnas raksturlielumiem, piemēram, poru izmēri, sadalītājs materiāls utt., izmantoto kolonnu skaits, garums un sakārtojums,

— kolonnas (vai to apvienojuma) teorētisko šķīvju skaits, sadalīšanas efektivitāte (sistēmas izšķirtspēja),

— informācija par pīķu simetriju,

— kolonnas temperatūra, temperatūras kontroles veids,

— detektors (mērījumu princips, tips, ķivetes tilpums),

— plūsmas mērītājs, ja to lieto (ražotājs, mērīšanas princips),

— reģistrēšanas un datu apstrādes sistēma (aparatūra, programmatūra).

2.2.3. **Sistēmas kalibrēšana**

— Kalibrēšanas līknes konstruēšanai izmantotās metodes sīks apraksts,

— informācija par šīs metodes kvalitātes kritērijiem (piemēram, korelācijas koeficients, kvadrātisko kļūdu summa utt.),

— informācija par visām ekstrapolācijām, eksperimenta procedūru, pieņēmumi un tuvinājumi novērtēšanas un datu apstrādes laikā,

— visiem mērījumiem, kas izmantoti kalibrācijas līknes konstruēšanai, jābūt dokumentētiem tabulā, kas ietver šādu informāciju katram kalibrācijas punktam:

  — parauga nosaukums,

  — parauga ražotājs,

  — standartu raksturīgās M_p, M_n, M_w un M_w/M_n vērtības, ko devis ražotājs vai kas iegūtas mērījumos, kā arī noteikšanas metožu detaļas,

  — iešļircinātais tilpums un iešļircinātā šķīduma koncentrācija,

▼B

— kalibrēšanā izmantotā M_p vērtība,

— eluēšanas tilpums vai koriģētais aiztures laiks, kas izmērīts pīķa maksimumā,

— pīķa maksimumā aprēķinātais M_p,

— aprēķinātā M_p kļūda procentos un kalibrēšanas vērtība.

2.2.4. **Novērtēšana**

— Novērtēšana, ņemot vērā laiku: metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu vajadzīgo atkārtojamību (koriģēšanas metode, iekšējais standarts utt.),

— informācija par to, vai novērtēšana veikta, pamatojoties uz eluēšanas tilpumu vai aiztures laiku,

— informācija par novērtēšanas robežām, ja pīķis nav pilnībā izanalizēts,

— nogludināšanas metožu apraksts, ja tādas ir lietotas,

— parauga iepriekšējās apstrādes un sagatavošanas procedūras,

— neizšķīdušu daļiņu klātbūtne, ja tādas ir,

— iešļircinātais tilpums µl un iešļircinātā šķīduma koncentrācija (mg/ml),

— novērojumi, kas norāda uz ietekmēm, kas rada novirzes no ideāla *GPC* profila,

— visu pārbaudes procedūras grozījumu sīks apraksts,

— detaļas par kļūdu diapazonu,

— visa pārējā informācija un novērojumi, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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

Papildinājums

Polimēru skaita vidējā molekulsvara (Mn) citu noteikšanas metožu piemēri

Gelhromatogrāfija (*GPC*) ir vispiemērotākā metode M_n noteikšanai, īpaši, ja ir pieejams standartu komplekts, kuru uzbūve ir salīdzināma ar polimēra uzbūvi. Tomēr, ja GPC izmantošanā ir praktiskas grūtības vai ir sagaidāms, ka viela neatbildīs noteicošajam M_n kritērijam (kas jāapstiprina), tad ir pieejamas alternatīvas metodes, piemēram:

1. **No molekulu skaita atkarīgo īpašību izmantošana**

1.1. Ebulioskopija/krioskopija

Ietver šķīdinātāja viršanas punkta paaugstinājuma (ebulioskopija) vai sasalšanas temperatūras pazeminājuma (krioskopija) mērīšanu, kad šķīdinātājam ir pievienots polimērs. Metode pamatojas uz to, ka izšķīdušā polimēra ietekme uz šķidruma vārīšanās/sasalšanas temperatūru ir atkarīga no polimēra molekulas masas (1) (2).

Pielietojamība: $M_n < 20\,000$.

1.2. Tvaika spiediena pazeminājums

Ietver izvēlētā standartšķidruma tvaika spiediena mērījumus pirms un pēc zināmu polimēra daudzumu pievienošanas (1) (2).

Pielietojamība: $M_n < 20\,000$ (teorētiski; praktiski tomēr metodes vērtība ir ierobežota).

1.3. Membrānas osmometrija

Pamatojas uz osmozes principu, t. i., šķīdinātāja molekulu tieksmi iet cauri puscaurlaidīgām membrānām no atšķaidītāka uz koncentrētāku šķīdumu, lai sasniegtu līdzsvaru. Šķīdinātāja iešana caur membrānu rada spiediena starpību, kas ir atkarīga no polimēra koncentrācijas un molekulu masas (1) (3) (4).

Pielietojamība: M_n starp 20 000–200 000.

1.4. Tvaika fāzes osmometrija

Saistīta ar tīra šķīdinātāja aerosola iztvaikošanas ātruma salīdzināšanu ar vismaz trīs aerosolu, kas satur polimēru dažādās koncentrācijās, iztvaikošanas ātrumu (1) (2) (4).

Pielietojamība: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Gala grupu analīze**

Lai izmantotu šo metodi, jāzina gan polimēra vispārējā uzbūve, gan ķēdes noslēdzošās grupas (kam jābūt atšķiramām no galvenā skeleta, piemēram, ar KMR metodi vai ar titrēšanu/derivatizāciju). Polimēra gala grupu molekulārās koncentrācijas noteikšana var noskaidrot molekulu masu lielumu (7) (8) (9).

Pielietojamība: M_n līdz 50 000 (ticamība samazinās, palielinoties molekulu masai).

3. **Izmantotā literatūra**

(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 Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane 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, p. 25–52.

(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: Determinationn 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, p. 2139–2146.

▼B

A.19. **MAZU MOLEKULU MASU SATURS POLIMĒROS**

1. **METODE**

Šī gelhromatogrāfijas metode ir *OECD* TG 119 (1996) kopija. Pamatprincipi un sīkāka tehniskā informācija ir dota atsaucēs.

1.1. IEVADS

Tā kā polimēru īpašības ir tik dažādas, ir neiespējami aprakstīt vienu metodi, kas precīzi izklāstītu sadalīšanas un novērtēšanas apstākļus, kas aptvertu visas iespējamības un īpatnības, kādas sastopamas polimēru sadalīšanā. Jo īpaši ar gelhromatogrāfiju (*GPC*) bieži nav analizējamas sarežģītas polimēru sistēmas. Ja *GPC* nav izmantojama, molekulas masu var noteikt ar citām metodēm (skatīt pielikumu). Tādos gadījumos būtu jāsniedz visas izmantotās metodes detaļas un pamatojums.

Šeit aprakstītā metode pamatojas uz DIN standartu 55672 (1). Sīki izstrādāta informācija, kā veikt eksperimentus un kā izvērtēt datus, ir atrodama šajā DIN standartā. Ja nepieciešams mainīt eksperimenta apstākļus, šīs izmaiņas jāpamato. Citus standartus var izmantot, ja dod visas atsauces. Šeit aprakstītā metode kalibrēšanai izmanto polistirola paraugus ar zināmu polidispersitāti, un tā varbūt jāmodificē, lai tā atbilstu noteiktiem polimēriem, piemēram, ūdenī šķīstošiem un sazarotiem polimēriem ar garu ķēdi.

1.2. DEFINĪCIJAS UN VIENĪBAS

Maza molekulas masa nosacīti ir definēta kā molekulas masa, kas mazāka par 1 000 daltoniem.

Skaita vidējo molekulas masu M_n un svara vidējo molekulas masu M_w nosaka, izmantojot šādus vienādojumus:

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

kur:

H_I = detektora signāla līmenis, skaitot no bāzes līnijas, aiztures tilpumam V_i,

M_i = polimēra frakcijas molekulas masa ar aiztures tilpumu V_i un n ir datu punktu skaits

Molekulu masu sadalījuma līknes platumu, kas ir sistēmas dispersitātes mērs, nosaka attiecība M_w/M_n.

▼B

1.3. STANDARTVIELAS

Tā kā GPC ir relatīva metode, jāizdara kalibrēšana. Parasti šim nolūkam izmanto lineāras uzbūves polistirola standartvielas ar zināmām molekulu masām M_n un M_w un ar šauru masu sadalījuma diapazonu. Nezināma parauga molekulas masas noteikšanai šo kalibrācijas līkni var izmantot tikai tad, ja sadalīšanas apstākļi paraugam un standartvielām ir izvēlēti identiski.

Noteiktā molekulu masu un eluēšanas tilpuma sakarība ir ticama tikai konkrēta eksperimenta specifiskos apstākļos. Šie apstākļi, pirmkārt, ietver temperatūru, šķīdinātāju (vai šķīdinātāju maisījumu), hromatografēšanas apstākļus un sadalīšanas kolonnu vai kolonnu sistēmu.

Šādi noteiktās parauga molekulu masas ir relatīvi lielumi, un tos apzīmē kā "polistirola ekvivalentās molekulu masas". Tas nozīmē, ka atkarībā no uzbūves un ķīmiskajām atšķirībām starp paraugu un standartiem molekulu masas lielākā vai mazākā mērā var atšķirties no absolūtajiem lielumiem. Ja izmanto citus standartus, piemēram, polietilenglikolu, polietilenoksīdu, polimetilmetakrilātu, poliakrilskābi, iemesls būtu jāpamato.

1.4. PĀRBAUDES METODES PRINCIPS

Ar *GPC* var noteikt gan parauga molekulu masu sadalījumu, gan vidējās molekulu masas (M_n, M_w). *GPC* ir īpaša veida šķidrumu hromatogrāfija, kas paraugu sadala atbilstīgi atsevišķo sastāvdaļu hidrodinamiskiem tilpumiem (2).

Sadalīšana notiek, paraugam ejot caur kolonnu, kas ir pildīta ar porainu materiālu, parasti ar organisku gelu. Mazas molekulas var iekļūt porās, kamēr lielas molekulas tur neiekļūst. Lielo molekulu ceļš tādēļ ir īsāks un tās eluējas pirmās. Vidēji lielas molekulas iekļūst dažās porās un eluējas vēlāk. Vismazākās molekulas, kuru vidējais hidrodinamiskais rādiuss ir mazāks par gela porām, var iekļūt visās porās. Tās eluējas visvēlāk.

Ideālā gadījumā sadalīšanu pilnībā nosaka molekulu lielums, bet praksē ir grūti izvairīties vismaz no dažām traucējošām absorbcijas ietekmēm. Nevienāds kolonnas pakojums un kolonnā nesorbēto vielu aiztures laiks var stāvokli vēl pasliktināt (2).

Detektēšanu veic, piemēram, izmantojot laušanas koeficientu vai UV absorbciju, un iegūst vienkāršu sadalījuma līkni. Lai uz līkni attiecinātu faktiskos molekulu masu lielumus, tomēr jākalibrē kolonna, caur to laižot polimērus ar zināmu molekulas masu un ideālā gadījumā ar aptuveni līdzīgu uzbūvi, piemēram, dažādus polistirola standartus. Parasti iegūst Gausa sadalījuma līkni, kas dažkārt ir izkropļota ar nelielu asti mazo molekulu masu pusē. Līknes vertikālā koordinātu ass rāda dažādu eluēto molekulu, kam ir atšķirīgas molekulu masas, svara daudzumus un horizontālā ass rāda molekulu masas logaritmu.

▼B

Mazu molekulu masu saturu izrēķina no šīs līknes. Aprēķins precīzs var būt tikai tad, ja vielas ar mazām molekulu masām izturas tāpat kā polimērs kopumā.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Eluēšanas tilpuma atkārtojamībai (relatīvajai standartnovirzei – *Relative Standard Deviation: RSD*) būtu jābūt labākai par 0,3 %. Analīzei vajadzīgā atkārtojamība jānodrošina, koriģējot ar iekšējo standartu, ja hromatogramma ir novērtēta kā atkarīga no laika un neatbilst iepriekš minētajam kritērijam (1). Polidispersitāte ir atkarīga no standartvielu molekulu masām. Polistirola standartu gadījumā parastie lielumi ir:

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

(M_p ir standartvielas molekulas masa pīķa maksimumā.)

1.6. PĀRBAUDES METODES APRAKSTS

1.6.1. **Polistirola standartšķīdumu pagatavošana**

Polistirola standartvielas izšķīdina izvēlētajā eluentā, rūpīgi maisot. Gatavojot šķīdumus, jāievēro ražotāja norādījumi.

Izvēlētās standartvielu koncentrācijas ir atkarīgas no vairākiem faktoriem, piemēram, iešļircināmā tilpuma, šķīduma viskozitātes un analīzes detektora jutības. Maksimālais iešļircināmais tilpums jāpieskaņo kolonnas garumam, lai izvairītos no pārslodzes. Parasti, izmantojot *GPC*, ja kolonnas izmēri ir 30 cm × 7,8 mm, iešļircināmie tilpumi analītiskām sadalīšanām ir starp 40 un 100 µl. Ir iespējams izmantot lielākus tilpumus, bet tiem nevajadzētu pārsniegt 250 µl. Pirms kolonnas faktiskās kalibrēšanas jānosaka optimālā attiecība starp iešļircināmo tilpumu un koncentrāciju.

1.6.2. **Parauga šķīduma pagatavošana**

Principā tās pašas prasības attiecas uz parauga šķīduma sagatavošanu. Paraugu izšķīdina piemērotā šķīdinātājā, piemēram, tetrahidrofurānā (THF), uzmanīgi kratot. Nekādā ziņā paraugu nedrīkst šķīdināt, izmantojot ultraskaņu. Ja vajadzīgs, parauga šķīdumu tīra caur membrānas filtru ar poru izmēriem starp 0,2 un 2 µm.

Neizšķīdušo daļiņu klātbūtne jāatzīmē galaprotokolā, jo tās var būt radušās vielu, kam ir lielāka molekulu masa, klātbūtnes dēļ. Būtu jāizmanto piemērota metode, lai noteiktu neizšķīdušo daļiņu svara procentus. Šķīdumi būtu jāizlieto 24 stundu laikā.

▼B

1.6.3. **Korekcija uz piemaisījumu un piedevu saturu**

Vielu ar M < 1 000 satura korekcija uz klātesošiem nepolimēru specifiskiem komponentiem (piemēram, piemaisījumiem vai piedevām) parasti ir nepieciešama, ja vien izmērītais saturs jau nav mazāks par 1 %. To veic ar *GPC* eluāta vai polimēra šķīduma tiešo analīzi.

Gadījumos, kad eluāta šķīdums pēc iznākšanas no kolonnas ir pārāk atšķaidīts tālākai analīzei, tas jāsakoncentrē. Var būt vajadzīgs eluātu ietvaicēt līdz sausam un vēlreiz atšķaidīt. Eluāta koncentrēšana jāveic apstākļos, kas nodrošina, ka eluātā nenotiek nekādas pārmaiņas. Eluāta apstrāde pēc *GPC* posma ir atkarīga no kvantitatīvai noteikšanai izmantojamās metodes.

1.6.4. **Aparatūra**

GPC iekārtai ir šādas galvenās sastāvdaļas:

— šķīdinātāja rezervuārs,

— eluenta atgāzētājs (ja vajadzīgs),

— sūknis,

— impulsu dempferis (ja vajadzīgs),

— iešļircināšanas sistēma,

— hromatogrāfijas kolonnas,

— detektors,

— plūsmas mērītājs (ja vajadzīgs),

— datu reģistrācijas un apstrādes sistēma,

— trauks atkritumiem.

Jānodrošina, lai *GPC* sistēma būtu inerta attiecībā uz lietojamiem šķīdinātājiem (piemēram, lietojot tērauda kapilārus THF šķīdinātājam).

1.6.5. **Iešļircināšanas un šķīdinātāja padeves sistēma**

Parauga šķīduma noteiktu daudzumu ievada kolonnā, vai nu izmantojot autosampleru, vai ar roku precīzi noteiktā zonā. Ja, ievadot ar roku, šļirces virzuli atvelk vai nospiež pārāk ātri, tas var mainīt novērojamo molekulu masu sadalījumu. Šķīdinātāja padeves sistēmai, cik iespējams, būtu jābūt bez impulsiem, ideālā gadījumā tajā būtu jābūt impulsu dempferim. Plūsmas ātruma kārtas lielums ir 1 ml/min.

1.6.6. **Kolonna**

Atkarībā no parauga polimēru analizē, izmantojot vai nu vienu kolonnu, vai vairākas secīgi savienotas kolonnas. Pārdošanā ir pieejami vairāki kolonnu materiāli ar noteiktām īpašībām (piemēram, poru lielumu, izslēgšanas robežas). Sadalītāja gela vai kolonnas garuma izvēle ir atkarīga no parauga īpašībām (hidrodinamiskais tilpums, molekulu masu sadalījums) un no specifiskiem sadalīšanas apstākļiem, piemēram, šķīdinātāja, temperatūras un plūsmas ātruma (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Teorētiskie šķīvji**

Sadalīšanai izmantotā kolonna vai kolonnu apvienojums jāraksturo ar teorētisko šķīvju skaitu. Ja par eluēšanas šķīdinātāju lieto THF, tas ietver etilbenzola vai citas piemērotas nepolāras vielas šķīduma ievadīšanu zināma garuma kolonnā. Teorētisko šķīvju skaitu aprēķina ar šādiem vienādojumiem:

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

kur:

N = teorētisko šķīvju skaits,

V_e = eluētais tilpums pīķa maksimuma punktā,

W = pīķa platums pie bāzes līnijas,

$W_{1/2}$ = pīķa platums pusē no augstuma.

1.6.8. **Sadalīšanas efektivitāte**

In addition to the number of theoretical plates, which is a quantity determining the bandwidth, a part is also played by the separation efficiency, this being determined by the steepness of the calibration curve. The separation efficiency of a column is obtained from the following relationship:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kur:

$V_{e,\ Mx}$ = polistirola ar molekulas masu Mx eluētais tilpums,

$V_{e,(10Mx)}$ = polistirola ar 10 reižu lielāku molekulas masu eluētais tilpums,

L = kolonnas šķērsgriezuma laukums

Sistēmas izšķirtspēju parasti nosaka šādi:

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

kur:

V_{e1}, V_{e2} = divu polistirola standartu eluēšanas tilpumi pīķa maksimumā,

W_1, W_2 = pīķa platumi pie bāzes līnijas,

M_1, M_2 = molekulu masas pīķu maksimumos (tām būtu jāatšķiras 10 reižu).

Kolonnu sistēmas R lielumam būtu jābūt lielākam par 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Šķīdinātāji**

Visiem šķīdinātājiem jābūt augstas tīrības (THF lieto ar tīrības pakāpi 99,5 %). Šķīdinātāja rezervuāram (ja vajadzīgs, inertas gāzes atmosfērā) jābūt pietiekami lielam, lai veiktu kolonnas kalibrēšanu un vairākas paraugu analīzes. Šķīdinātājs jāatbrīvo no gāzēm, pirms to ar sūkni pievada kolonnai.

1.6.10. **Temperatūras kontrole**

Svarīgāko iekšējo sastāvdaļu (inžektora cilpas, kolonnu, detektora un cauruļu) temperatūrai būtu jābūt konstantai un atbilstošai izvēlētajam šķīdinātājam.

1.6.11. **Detektors**

Detektoram kvantitatīvi jāreģistrē no kolonnas eluētā parauga koncentrācija. Lai izvairītos no nevajadzīgas pīķa paplašināšanās, detektora šūnas ķivetes tilpumam vajadzētu būt pēc iespējas mazākam. Tam nevajadzētu būt lielākam par 10 µl, izņemot gaismas izkliedes un viskozitātes detektorus. Parasti detektēšanai izmanto diferenciālo refraktometriju. Tomēr, ja tas vajadzīgs parauga vai eluēšanas šķīdinātāja specifisko īpašību dēļ, var izmantot citu veidu detektorus, piemēram, UV/VIS, IR, viskozitātes detektorus utt.

2. **DATI UN PROTOKOLĒŠANA**

2.1. DATI

Detalizētus izvērtēšanas kritērijus un prasības, kas attiecas uz datu savākšanu un apstrādi, skatīt DIN standartā (1).

Katram paraugam jāizdara divi neatkarīgi eksperimenti. Tie jāanalizē atsevišķi. Visos gadījumos ir būtiski svarīgi iegūt arī tukšo mēģinājumu datus tādos pašos apstākļos, kā veikta parauga analīze.

Skaidri jānorāda, ka izmērītie lielumi ir relatīvi lielumi, kas ir ekvivalenti lietotā standarta molekulu masām.

Pēc aiztures tilpumu vai aiztures laiku noteikšanas (iespējams, koriģējot ar iekšējo standartu) log M_p lielumus (M_p ir kalibrēšanas standarta pīķa maksimuma vērtība) atliek grafikā pret vienu no minētajiem lielumiem. Vajadzīgi vismaz divi kalibrēšanas punkti uz molekulu masas dekādi, visai līknei vajadzīgi vismaz pieci kalibrēšanas punkti, kam būtu jāietver parauga noteiktā molekulas masa. Kalibrēšanas līknes zemāko molekulu masu galapunktu nosaka ar n-heksilbenzolu vai citu piemērotu nepolāru izšķīdināmo vielu. Līknes daļu, kas atbilst molekulu masām zem 1 000, nosaka un, ja vajadzīgs, koriģē attiecībā uz piemaisījumiem un piedevām. Eluēšanas līknes parasti izvērtē ar elektronisko datu apstrādi. Skaitļojot ar roku, var konsultācijai izmantot ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Ja kolonnā ir aizturēts kāds nešķīstošs polimērs, tā molekulas masa varētu būt lielāka par šķīstošo frakciju molekulas masu un, ja to neņem vērā, zemo molekulu masu saturu novērtē pārāk augstu. Pielikumā dotas vadlīnijas, kā koriģēt zemo molekulu masu saturu uz nešķīstoša polimēra klātbūtni.

Sadalījuma līkne jāsagatavo tabulas vai zīmējuma veidā (diferenciālais biežums vai procenti no summas pret log M). Attēlojot grafiski, vienai molekulu masas dekādei būtu jābūt ap 4 cm platai un pīķa maksimumam būtu jābūt ap 8 cm augstam. Integrālajām sadalījuma līknēm starpībai uz ordinātas starp 0 un 100 % vajadzētu būt ap 10 cm.

2.2. PĀRBAUDES PROTOKOLS

Pārbaudes protokolam jāietver šāda informācija:

2.2.1. **Pārbaudāmā viela**

— Pieejamā informācija par analizējamo vielu (identiskums, piedevas, piemaisījumi),

— parauga apstrādes apraksts, novērojumi, problēmas.

2.2.2. **Iekārtas**

— Eluenta rezervuārs, inerta gāze, eluenta atgāzēšana, eluenta sastāvs, piemaisījumi,

— sūknis, impulsu dempferis, inžektora sistēma,

— sadalīšanas kolonnas (ražotājs, visa informācija par kolonnas raksturlielumiem, piemēram, poru izmēri, sadalīšanas materiāls utt., izmantoto kolonnu skaits, garums un sakārtojums),

— kolonnas (vai to apvienojuma) teorētisko šķīvju skaits, sadalīšanas efektivitāte (sistēmas izšķirtspēja),

— informācija par pīķu simetriju,

— kolonnas temperatūra, temperatūras kontroles veids,

— detektors (mērījumu princips, tips, ķivetes tilpums),

— plūsmas mērītājs, ja to lieto (ražotājs, mērīšanas princips),

— reģistrēšanas un datu apstrādes sistēma (aparatūra, programmatūra).

2.2.3. **Sistēmas kalibrēšana**

— Kalibrēšanas līknes konstruēšanai izmantotās metodes sīks apraksts,

▼B

— informācija par šīs metodes kvalitātes kritērijiem (piemēram, korelācijas koeficients, kvadrātisko kļūdu summa utt.),

— informācija par visām ekstrapolācijām, eksperimenta procedūru, novērtēšanas un datu apstrādes laikā izdarītie pieņēmumi un tuvinājumi,

— visiem mērījumiem, kas izmantoti kalibrācijas līknes konstruēšanai, jābūt dokumentētiem tabulā, kas ietver šādu informāciju katram kalibrācijas punktam:

— parauga nosaukums,

— parauga ražotājs,

— standartu raksturīgās M_p, M_n, M_w un M_w/M_n vērtības, ko devis ražotājs vai kas iegūtas mērījumos, kā arī noteikšanas metožu detaļas,

— iešļircinātais tilpums un iešļircinātā šķīduma koncentrācija,

— kalibrēšanā izmantotā M_p vērtība,

— eluēšanas tilpums vai koriģētais aiztures laiks, kas izmērīts pīķa maksimumā,

— pīķa maksimumā aprēķinātais M_p,

— aprēķinātā M_p kļūda procentos un kalibrēšanas vērtība.

2.2.4. **Informācija par polimēra saturu ar zemu molekulas masu**

— Analīzē izmantoto metožu apraksts un veids, kā eksperimenti veikti,

— informācija par vielu ar mazu molekulas masu procentuālo daudzumu (svars/svars) attiecībā uz visu paraugu,

— informācija par piemaisījumiem, piedevām un citu vielu, kas nav polimēri, saturu svara procentos attiecībā uz visu paraugu.

2.2.5. **Novērtēšana**

— Novērtēšana, ņemot vērā laiku: visas metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu vajadzīgo atkārtojamību (koriģēšanas metode, iekšējais standarts utt.),

— informācija par to, vai novērtēšana veikta, pamatojoties uz eluēšanas tilpumu vai aiztures laiku,

— informācija par novērtēšanas robežām, ja aparatūra pīķi nav pilnīgi izanalizējusi,

— nogludināšanas metožu apraksts, ja tādas ir lietotas,

— parauga pirmapstrādes un pirmsagatavošanas procedūras,

— neizšķīdušu daļiņu klātbūtne, ja tādas ir,

▼B

— iešļircinātais tilpums (µl) un iešļircinātā šķīduma koncentrācija (mg/ml),

— novērojumi, kas norāda uz ietekmēm, kas rada novirzes no ideāla *GPC* profila,

— visu analīzes procedūras grozījumu sīks apraksts,

— detaļas par kļūdu diapazonu,

— cita informācija un novērojumi, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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

Papildinājums

Norādījumi mazmolekulāru vielu satura koriģēšanai nešķīstoša polimēra klātbūtnē

Ja paraugā ir klāt nešķīstošs polimērs, tad GPC analīzes laikā rodas masas zudums. Nešķīstošo polimēru neatgriezeniski aiztur kolonnā vai uz parauga filtra, bet parauga šķīstošā daļa iziet cauri kolonnai. Ja polimēra laušanas koeficienta inkrementu (dn/dc) var novērtēt vai izmērīt, var novērtēt kolonnā zudušo parauga masu. Šajā gadījumā izdara korekciju, izmantojot ārējo kalibrēšanu ar standartmateriāliem, kam ir zināma koncentrācija un dn/dc, lai nokalibrētu refraktometra atbildes signālu. Turpmāk minētajā piemērā ir izmantots polimetilmetakrilāta (pMMA) standarts.

Ārējā kalibrēšanā, lai veiktu akrilpolimēru analīzi ar GPC metodi, analizē zināmas koncentrācijas pMMA standartšķīdumu tetrahidrofurānā un iegūtos datus izmanto, lai atrastu refraktometra konstanti saskaņā ar vienādojumu:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kur:

K = refraktometra konstante (mikrovoltsekundes/ml),

R = atbildes signāls uz pMMA standartu (mikrovoltsekundes),

C = pMMA standarta koncentrācija (mg/ml),

V = iešļircināmais tilpums (ml) un

dn/dc = laušanas koeficienta inkrements pMMA šķīdumam tetrahidrofurānā (ml/mg).

PMMA standartam ir raksturīgi šādi dati:

R = 2 937 891,

C = 1,07 mg/ml,

V = 0,1 ml,

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Iegūto K vērtību $3{,}05 \times 10^{11}$ izmanto, lai aprēķinātu detektora teorētisko atbildes signālu, ja 100 % no iešļircinātā polimēra ir eluēts caur detektoru.

▼B

A.20. **POLIMĒRU ŠĶĪŠANA/EKSTRAKCIJA ŪDENĪ**

1. **METODE**

Aprakstītā metode ir *OECD* TG 120 (1997) pārskatītās versijas kopija. Sīkāku tehnisku informāciju skatīt izmantotās literatūras sarakstā (1).

1.1. IEVADS

Dažiem polimēriem, tādiem kā emulsiju polimēri, var būt vajadzīgs sākotnējs sagatavošanas darbs, pirms var izmantot turpmāk aprakstīto metodi. Šo metodi nevar izmantot šķidriem polimēriem un polimēriem, kas analīzes apstākļos reaģē ar ūdeni.

Ja metodi izmantot nav praktiski vai nav iespējams, šķīšanu/ekstrakciju var pētīt ar citām metodēm. Tādos gadījumos jādod pilnīgas izmantotās metodes detaļas un pamatojums.

1.2. STANDARTVIELAS

Nav.

1.3. PĀRBAUDES METODES PRINCIPS

Polimēru šķīšanu/ekstrakciju ūdens vidē nosaka, izmantojot kolbas metodi (skatīt A.6. "Šķīdība ūdenī; Kolbas metode"), kas ir modificēta, kā aprakstīts turpmāk.

1.4. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.5. PĀRBAUDES METODES APRAKSTS

1.5.1. **Iekārtas**

Metodei ir vajadzīgas šādas iekārtas:

— sasmalcināšanas ierīce, piemēram, smalcinātājs, lai veidotu zināma lieluma daļiņas,

— kratītājs ar temperatūras kontroles iespējām,

— membrānas filtru sistēma,

— piemērots ķīmiskais aprīkojums,

— standartizēti sieti.

1.5.2. **Parauga sagatavošana**

Reprezentatīvs paraugs vispirms jāsamazina līdz daļiņu izmēriem 0,125 un 0,25 mm, izmantojot piemērotus sietus. Parauga stabilizēšanai vai sasmalcināšanas procesam var būt vajadzīga dzesēšana. Sveķiem līdzīgus materiālus var sasmalcināt šķidrā slāpekļa temperatūrā (1).

Ja frakcija ar vajadzīgā lieluma daļiņām nav iegūstama, jārīkojas tā, lai daļiņu lielumu samazinātu tik lielā mērā, cik tas iespējams, un rezultāts jāprotokolē. Protokolā jānorāda, kā sasmalcinātais paraugs ir glabāts pirms pārbaudes.

▼B

1.5.3. **Procedūra**

Trīs paraugus, kas satur pa 10 g analizējamās vielas, nosver katru savā traukā, kam ir stikla aizbāžņi, un katrā traukā pievieno 1 000 ml ūdens. Ja rīcība ar 10 g polimēra izrādās neizpildāma, jāizmanto nākošais lielākais daudzums, ar ko var rīkoties, un attiecīgi jāpieskaņo ūdens tilpums.

Traukus cieši noslēdz un pēc tam krata 20^{o} temperatūrā. Jālieto kratīšanas vai maisīšanas ierīce, kas var darboties konstantā temperatūrā. Pēc 24 stundām katra trauka saturu centrifugē vai nofiltrē un ar piemērotu analītisku metodi nosaka polimēra daudzumu dzidrajā ūdens fāzē. Ja ūdens fāzei piemērotas analītiskas metodes nav pieejamas, tad kopējo šķīdību/ekstrahējamību var noteikt no filtrēšanas atlikuma vai centrifugēto nogulšņu sausā atlikuma.

Parasti ir nepieciešams kvantitatīvi atšķirt piemaisījumus un piedevas, no vienas puses, un vielas ar mazu molekulas masu, no otras puses. Nosakot gravimetriski, ir arī svarīgi izdarīt tukšo mēģinājumu bez analizējamās vielas, lai ņemtu vērā novirzes, kas rodas eksperimenta procedūras dēļ.

Polimēru šķīdību/ekstrahējamību ūdenī pie 37 ^{o}C un pH 2 un pH 9 var noteikt tāpat, kā ir aprakstīts eksperimenta izpildei pie 20 ^{o}C. Vajadzīgās pH vērtības var sasniegt, pieliekot vai nu piemērotus buferšķīdumus, vai piemērotas skābes vai bāzes, piemēram, sālsskābi, etiķskābi, nātrija vai kālija hidroksīdu(analīžu kvalitātes), vai NH_3.

Atkarībā no izmantotās analīžu metodes būtu jāizdara viens vai divi mēģinājumi. Ja ir pieejamas pietiekami specifiskas metodes ūdens fāzes tiešai analīzei uz polimēra komponentu, viens mēģinājums, kā aprakstīts iepriekš, ir pietiekams. Ja tādas metodes nav pieejamas un polimēra šķīdības/ekstrahējamības noteikšana ir ierobežota ar netiešu analīzi, nosakot ūdens ekstrakta kopējo oglekļa saturu (*Total Organic Carbon Content – TOC*), tad tomēr būtu jāveic papildu analīze. Šī papildu analīze būtu jāveic arī trešoreiz, lietojot 10 reizes mazāku polimēra paraugu un to pašu ūdens daudzumu, kas lietots pirmajā mēģinājumā.

1.5.4. **Analīze**

1.5.4.1. *Mēģinājums, ko veic ar viena lieluma paraugu*

Var būt pieejamas metodes polimēra komponentu tiešai analīzei ūdens fāzē. Alternatīvi var apsvērt arī izšķīdušo/ekstrahēto polimēru komponentu netiešo analīzi, nosakot kopējo šķīstošo daļu saturu un koriģējot uz nepolimēru specifiskiem komponentiem.

Ūdens fāzes analīze kopējā polimēru saturu noteikšanai ir iespējama:

vai nu ar pietiekami jutīgu metodi, piemēram:

— *TOC*, izmantojot noārdīšanu ar persulfātu vai dihromātu līdz CO_2 un sekojošu noteikšanu, izmantojot IR vai ķīmisko analīzi,

▼B

— atomu absorbcijas spektrometriju (AAS) vai ar tās induktīvi saistīto plazmas (*ICP*) emisijas ekvivalento metodi silīciju un metālus saturošiem polimēriem,

— UV absorbcijas vai spektrofluorimetriju arilpolimēriem,

— LC-MS (šķidrumu hromatogrāfija-masspektometrija) paraugiem ar mazu molekulas masu,

vai ūdens ekstraktu iztvaicējot vakuumā līdz sausam atlikumam un atlikumu analizējot ar spektroskopiskām metodēm (IR, UV utt.) vai ar AAS/*ICP* analīzi.

Ja ūdens fāzes analīzi nevar izdarīt tieši, ūdens ekstrakts būtu jāekstrahē ar šķīdinātāju, kas nejaucas ar ūdeni, piemēram, hloru saturošiem ogļūdeņražiem. Šķīdinātāju pēc tam iztvaicē un atlikumu analizē, lai noteiktu attiecīgā polimēra saturu, kā iepriekš minēts. Visu to komponentu saturs, kas identificēti kā piemaisījumi vai piedevas, jāatņem, lai noteiktu paša polimēra šķīdības/ekstrahēšanas pakāpi.

Ja klāt ir relatīvi lieli šādu vielu daudzumi, var būt vajadzīgs atlikumam izdarīt, piemēram, HPLC vai GC analīzi, lai atšķirtu klātesošo monomēru un no monomēriem atvasinātu vielu piemaisījumus tā, lai varētu noteikt šo pēdējo vielu īsto saturu.

Dažos gadījumos var būt pietiekami, ja organisko šķīdinātāju vienkārši iztvaicē līdz sausam un sauso atlikumu nosver.

1.5.4.2. *Analīze parauga diviem dažādiem lielumiem*

Visus ūdens ekstraktus analizē, lai noteiktu *TOC*.

Gravimetrisko noteikšanu izdara neizšķīdušai/neizekstrahētai parauga daļai. Ja pēc katra trauka satura centrifugēšanas vai filtrēšanas polimēra atlikums paliek pielipis pie trauka sienām, trauks jāskalo ar filtrātu, līdz no trauka ir notīrītas jebkādas redzamas daļiņas. Pēc tam filtrātu vēlreiz centrifugē vai filtrē. Atlikumu, kas palicis uz filtra vai centrifugēšanas caurulītē, žāvē vakuumā 40 ^{o}C temperatūrā un nosver. Žāvē līdz konstantam svaram.

2. **DATI**

2.1. VIENA LIELUMA PARAUGA ANALĪZE

Jāuzrāda atsevišķie rezultāti katrai no trim kolbām un vidējie lielumi, kas izteikti masas vienībās šķīduma tilpumā (parasti mg/l) vai masas vienībās uz polimēra masas vienību (parasti mg/g). Bez tam jāuzrāda arī parauga masas zudums (ko aprēķina kā izšķīdušās vielas masas dalījumu ar sākotnējā parauga masu). Jāizrēķina relatīvās standartnovirzes (*RSD – relative standart deviation*). Jādod arī atsevišķie skaitļi par kopējo analizējamo paraugu (polimērs + svarīgākās piedevas utt.) un pašu polimēru (t. i., pēc šādu piedevu satura atskaitīšanas).

▼B

2.2. DIVU DAŽĀDU PARAUGA LIELUMU ANALĪZE

Jāsniedz divu trīskārt atkārtotu eksperimentu *TOC* lielumi ūdens ekstraktiem un katra eksperimenta vidējais lielums, kas izteikts masas vienībās šķīduma tilpumā (parasti mgC/l), kā arī masas vienības uz sākotnējā parauga masu (parasti mgC/g).

Ja nav atšķirību starp rezultātiem lielai un mazai parauga/ūdens attiecībai, tas var norādīt, ka ekstrahējamie komponenti tiešām ir ekstrahējušies. Tādā gadījumā parasti tiešā analīze nav vajadzīga.

Jādod atsevišķās atlikumu masas, un tās jāizsaka procentos no paraugu sākotnējām masām. Katram eksperimentam jāizrēķina vidējie lielumi. Starpības starp 100 % un atrastajiem procentiem ir šķīstošās un ekstrahējamās vielas procentuālais daudzums sākotnējā paraugā.

3. **PROTOKOLI**

3.1. PĀRBAUDES PROTOKOLS

Pārbaudes protokolā jābūt šādai informācijai:

3.1.1. **Pārbaudāmā viela**

— Pieejamā informācija par analizējamo vielu (identitāte, piedevas, piemaisījumi, vielu saturs ar mazu molekulas masu).

3.1.2. **Eksperimenta apstākļi**

— Izmantoto procedūru un eksperimenta apstākļu apraksts,

— analīzes un detektēšanas metožu apraksts.

3.1.3. **Rezultāti**

— Šķīdība/ekstrahējamība mg/l; atsevišķie un vidējie lielumi ekstrakcijas analīzēm dažādos šķīdinātājos, atsevišķi uzdodot polimēru saturu un piemaisījumus, piedevas utt.,

— polimēra šķīdība/ekstrahējamība mg/g,

— ūdens ekstraktu *TOC* lielumi, izšķīdušās vielas svars un izrēķinātie procenti, ja tie ir mērīti,

— katra parauga pH,

— informācija par tukšos mēģinājumos iegūtiem lielumiem,

— ja vajadzīgs, norādes uz analizējamā parauga nestabilitāti pārbaudes un analīzes procesā,

— visa informācija, kas ir svarīga rezultātu interpretācijai.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prufzwecke.

▼B

A.21. **OKSIDIZĒJOŠAS ĪPAŠĪBAS (ŠĶIDRUMI)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šī testa metode paredzēta, lai noteiktu šķidruma spēju palielināt degošu vielu degšanas ātrumu vai degšanas intensitāti vai arī spēju veidot pašaizdegošos maisījumu ar degošu vielu, tos rūpīgi sajaucot. Metodes pamatā ir ANO oksidējošu šķidrumu tests (1), un tā ir šim testam līdzvērtīga. Tomēr tāpēc, ka šī metode A21. galvenokārt paredzēta, lai ievērotu Regulu (EK) Nr. 1907/2006, ir nepieciešams salīdzinājums tikai ar vienu standartvielu. Testēšana un salīdzinājums ar papildu standartvielām var būt vajadzīgi gadījumos, kad testu rezultātus izmanto citiem nolūkiem ([1]).

Šis tests nav jāveic gadījumos, kad vielas struktūrformula nepārprotami liecina, ka viela nevar stāties eksotermiskās reakcijās ar viegli uzliesmojošiem materiāliem.

Pirms noteikt šo rādītāju, ir lietderīgi iegūt sākotnēju informāciju par testējamās vielas iespējamo sprādzienbīstamību.

Šī metode nav izmantojama cietvielām, gāzēm, sprādzienbīstamām vai viegli uzliesmojošām vielām un organiskajiem peroksīdiem.

Testēšana pēc šīs metodes nav jāveic, ja jau ir pieejami attiecīgās vielas testēšanas rezultāti pēc ANO oksidējošu šķidrumu testa (1).

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Vidējais spiediena paaugstināšanās laiks ir vidējais laiks, kādā testējamais maisījums izraisa spiediena paaugstināšanos no 690 kPa līdz 2 070 kPa virs atmosfēras spiediena.

1.3. STANDARTVIELA

Par standartvielu izmanto (analītiski tīru) 65 % (masas %) slāpekļskābes ūdens šķīdumu ([2]).

([1]) Piemēram, ANO transporta noteikumu satvarā.
([2]) Skābe pirms testēšanas jātitrē, lai apstiprinātu tās koncentrāciju.

▼B

Ja eksperimentators paredz, ka testēšanas rezultātus, iespējams, izmantos arī citiem nolūkiem ([1]), var būt lietderīgi papildus testēt arī citas standartvielas ([2]).

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Testējamo šķidrumu masas attiecībā 1:1 sajauc ar celulozes šķiedru un ievieto spiedtvertnē. Ja maisījuma sajaukšanas vai ievietošanas laikā notiek pašaizdegšanās, testēšanu neturpina.

Ja nenotiek pašaizdegšanās, testēšanu veic pilnībā. Maisījumu spiedientvertnē karsē un nosaka vidējo laiku, kādā spiediens paaugstinās no 690 kPa līdz 2 070 kPa virs atmosfēras spiediena. To salīdzina ar vidējo spiediena paaugstināšanās laiku, kāds ir standartvielas(-u) un celulozes maisījumam attiecībā 1:1.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Piecu izmēģinājumu rezultāti ar vienu vielu nedrīkst atšķirties vairāk par 30 % no to vidējās aritmētiskās vērtības. Izbrāķē rezultātus, kas no vidējās aritmētiskās vērtības atšķiras vairāk par 30 %, testēšanu atkārto pēc maisījuma sajaukšanas un ievietošanas procedūras pilnveidošanas.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošana**

1.6.1.1. *Viegli uzliesmojoša viela*

Par viegli uzliesmojošu materiālu izmanto sausas celulozes šķiedras ar šķiedru garumu no 50 līdz 250 μm un vidējo diametru 25 μm ([3]). Celulozi līdz nemainīgai masai četras stundas žāvē līdz 25 mm biezā slānī 105 °C temperatūrā, pēc tam atdzesē un līdz lietošanai glabā eksikatorā virs žāvētāja. Sausas celulozes mitruma saturs nedrīkst pārsniegt 0,5 % no bezūdens masas ([4]). Lai to panāktu, žāvēšanas laiks, ja vajadzīgs, ir jāpagarina ([5]). Visai testēšanai jāizmanto celuloze no vienas un tās pašas partijas.

([1]) Piemēram, ANO transporta noteikumu satvarā.
([2]) Piemēram, literatūras sarakstā (1) izmantoti 50 masas % perhlorskābes un 40 masas % nātrija hlorāta šķīdumi.
([3]) Piemēram, Vatmaņa celulozes pulveris kolonnu hromatogrāfijai CF 11, kataloga Nr. 4021 050.
([4]) Apstiprina, piemēram, titrējot pēc Fišera metodes.
([5]) Šādu ūdens saturu var panākt arī, piemēram, 24 h karsējot 105 °C temperatūrā vakuumā.

▼B

1.6.1.2. *Iekārta*

1.6.1.2.1. Spiedtvertne

Nepieciešama spiedtvertne. Tvertne sastāv no 89 mm gara tērauda spiedtvertnes ar ārējo diametru 60 mm (skatīt 1. attēlu). Cilindra pretējās pusēs izslīpētas divas plakanas virsmas (samazinot šķērsgriezumu līdz 50 mm), ko izmanto fiksēšanai, ieskrūvējot ventilācijas atveres ventili un aizdedzināšanas ventili. Tvertnes abos galos ir izveidots 19 mm dziļš urbums 20 mm diametrā ar iekšējo Lielbritānijas standarta 1' cauruļvītni vai tai līdzvērtīgu metriskās sistēmas vītni. Spiediena novada īscauruli ieskrūvē spiedtvertnes liektajā virsmā 90° leņķī pret izslīpētajām plakanajām virsmām 35 mm attālumā no viena gala. Šim nolūkam līdz 12 mm dziļumam izveido urbumu un iegriež ½' Lielbritānijas standarta cauruļvītni (vai tai līdzvērtīgu metriskās sistēmas vītni), kas atbilst īscaurules vītnei. Ja vajadzīgs, hermētiskuma nodrošināšanai izmanto inerta materiāla blīvi. Īscaurules garums ārpus spiedtvertnes korpusa ir 55 mm, un tās urbuma diametrs ir 6 mm. Īscaurules galā ir urbums ar vītni, kurā ieskrūvē diafragmas tipa spiediena devēju. Var izmantot visas spiediena mērīšanas ierīces, kuru darbību neietekmē karstas gāzes vai sadalīšanās produkti un kuru reakcijas laiks uz spiediena paaugstināšanos no 690 līdz 2 070 kPa nepārsniedz 5 m/s.

No īscaurules attālāko spiedtvertnes galu noslēdz ar aizdedzināšanas ventili, kas sastāv no diviem elektrodiem, no kuriem viens izolēts no ierīces aizbāžņa, bet otrs ar to savienots. Spiedtvertnes otru galu noslēdz ar pārraujamu disku (pārraušanas spiediens apmēram 2 200 kPa), ko nostiprina ar uzgriezni, kurā ir 20 mm diametra urbums. Ja vajadzīgs, aizdedzināšanas ventiļa hermētiskuma nodrošināšanai izmanto inerta materiāla blīvi. Lietošanas laikā ierīci pareizā stāvoklī notur statīvā (2. attēls). Tas parasti sastāv no mazleģēta tērauda pamatloksnes (235 mm × 184 mm x 6 mm) un 180 mm gara doba kvadrātveida šķērsgriezuma (70 mm × 70 mm × 4 mm) profila.

No kvadrātveida šķērsgriezuma profila pretējās pusēs vienā galā izveidots izgriezums tā, ka izveidojas konstrukcija ar divām plakanām gludām kājām ar 86 mm garu neskartu daļu. Šīs plakanās daļas nogriež 60° leņķī pret horizontāli un piemetina pamatplatei. Pamatnes augšējā daļā vienā pusē izgriež 22 mm platu 46 mm dziļu spraugu tā, lai, statīvā ievietojot spiedtvertnes mezglu ar aizdedzināšanas ventili uz leju, spraugā atrastos īscaurule. Apakšējai iekšējai virsmai piemetina 30 mm platu un 6 mm biezu tērauda gabaliņu, kas kalpo par starpliku. Spiedtvertni cieši fiksē ar divām pretējā virsmā ieskrūvētām 7 mm spārnskrūvēm. No apakšas spiedtvertni balsta divas 12 mm platas 6 mm biezas tērauda lentes, kas piemetinātas sānu gabaliem un pieguļ pamatnei.

▼B

1.6.1.2.2. Aizdedzināšanas sistēma

Aizdedzināšanas sistēma sastāv no 25 cm garas 0,6 mm diametra nihroma stieples ar pretestību 3,85 omi/m. Stiepli uz 5 mm diametra stieņa savij spirālē un piestiprina aizdedzināšanas ventiļa elektrodiem. Spirāli savij kādā no 3. attēlā parādītajiem veidiem. Aizdedzināšanas spirāles apakšai jābūt vismaz 20 mm attālumā no tvertnes dibena. Ja elektrodi nav regulējami, aizdedzināšanas stieples gali starp spirāli un tvertnes apakšu jāizolē ar keramikas apvalku. Stiepli sakarsē no pastāvīga barošanas avota, kas nodrošina vismaz 10 A stipru strāvu.

1.6.2. **Testa norise** ([1])

Iekārtu ar uzmontētu spiediena devēju un aizdedzināšanas sistēmu, neuzstādot pārraujamo disku, nostiprina statīvā ar aizdedzināšanas ventili uz leju. Stikla vārglāzē ar stikla spieķīti sajauc 2,5 g testējamā šķidruma ar 2,5 g sausas celulozes ([2]). Drošības labad sajaukšana jāveic, lietotājam atrodoties aiz aizsargekrāna. Ja maisījums aizdegas tā sajaukšanas vai iepildīšanas laikā, testēšana nav jāturpina. Maisījumu nelielās daļās sablīvējot pārnes spiedtvertnē un raugās, lai maisījums tiktu sablīvēts ap aizdedzināšanas spirāli un ir ar to labā kontaktā. Svarīgi, lai sablīvēšanas laikā spirāle netiktu deformēta, jo tādēļ var iegūt kļūdainus rezultātus ([3]). Ievieto pārraujamo disku un to nostiprina, cieši ieskrūvējot uzgriezni. Uzpildīto tvertni ar pārraujamo disku uz augšu ievieto statīvā velkmes skapī vai dedzināšanas kamerā. Aizdedzināšanas ventiļa ārējos izvadus pieslēdz elektrībai un padod 10 A stipru strāvu. Laiks no maisījuma sajaukšanas līdz elektriskās strāvas ieslēgšanai nedrīkst pārsniegt 10 minūtes.

Spiediena devēja signālu reģistrē, izmantojot piemērotu reģistrācijas sistēmu, kas nodrošina gan radītā spiediena izmaiņu novērtēšanu, gan pastāvīgu reģistrēšanu (piemēram, pārejas procesu reģistrētājs, kas apvienots ar diagrammas reģistrētāju). Maisījumu karsē, līdz saplīst pārraujamais disks vai vismaz 60 sekundes. Ja pārraujamais disks nesaplīst, pirms iekārtu izjaukt, maisījumam ļauj atdzist, veicot piesardzības pasākumus, kas saistīti ar iespējamo spiediena paaugstināšanos iekārtā. Testējamās vielas un standartvielas(-u) izmēģinājumus atkārto piecas reizes. Atzīmē laiku, kādā paaugstinās spiediens no 690 kPa līdz 2 070 kPa virs atmosfēras spiediena. Aprēķina vidējo spiediena paaugstināšanās laiku.

Dažkārt vielas var izraisīt spiediena paaugstināšanos (pārlieku augstu vai pārāk zemu) ar to oksidējošajām īpašībām nesaistītu ķīmisko reakciju dēļ. Šādos gadījumos, lai noskaidrotu reakcijas raksturu, testēšana var būt jāatkārto, celulozes vietā izmantojot inertas vielas, piemēram, diatomītu (kizelguru).

([1]) Oksidētāju maisījumi ar celulozi jāuzskata par potenciāli sprādzienbīstamiem, un ar tiem jāstrādā, ievērojot attiecīgus piesardzības pasākumus.

([2]) Praktiski to var izdarīt, sagatavojot testējamā šķidruma 1:1 maisījumu ar celulozi lielākā daudzumā, nekā izmēģinājumiem vajadzīgs, un pārnesot 5 ± 0,1 g spiedtvertnē. Katram izmēģinājumam jāsagatavo jauns maisījums.

([3]) Jo īpaši nedrīkst saskarties spirāles blakus vijumi.

▼B

2. **REZULTĀTI**

Spiediena paaugstināšanās laiks testējamās vielas un standartvielas(-u) izmēģinājumos. Spiediena paaugstināšanās laiks izmēģinājumos ar inertu vielu, ja tie tiek veikti.

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Aprēķina vidējo spiediena paaugstināšanās laiku testējamajai vielai un standartvielai(-ām).

Aprēķina vidējo spiediena paaugstināšanās laiku izmēģinājumos ar inertu vielu (ja tiek veikti).

Daži rezultātu piemēri norādīti 1. tabulā.

1. tabula

Rezultātu piemēri [a]

Viela [b]	Vidējais spiediena paaugstināšanās laiks 1:1 maisījumam ar celulozi (m/s)
Amonija dihromāts, piesātināts ūdens šķīdums	20 800
Kalcija nitrāts, piesātināts ūdens šķīdums	6 700
Dzelzs nitrāts, piesātināts ūdens šķīdums	4 133
Litija perhlorāts, piesātināts ūdens šķīdums	1 686
Magnija perhlorāts, piesātināts ūdens šķīdums	777
Niķeļa nitrāts, piesātināts ūdens šķīdums	6 250
Slāpekļskābe, 65 %	4 767 [c]
Perhlorskābe, 50 %	121 [c]
Perhlorskābe, 55 %	59
Kālija nitrāts, 30 % ūdens šķīdums	26 690
Sudraba nitrāts, piesātināts ūdens šķīdums	[d]
Nātrija hlorāts, 40 % ūdens šķīdums	2 555 [c]
Nātrija nitrāts, 45 % ūdens šķīdums	4 133
Inerta viela	
Ūdens – celuloze	[d]

[a] Klasifikācijai pēc ANO transporta shēmas skatīt izmantotās literatūras sarakstā (1).
[b] Piesātinātie šķīdumi jāpagatavo 20 °C.
[c] Starplaboratoriju salīdzinošajā izmēģinājumā noteiktā vidējā vērtība.
[d] Maksimālais spiediens 2 070 kPa nav sasniegts.

▼B

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija:

— testējamās vielas identifikācija, sastāvs, tīrība u. c.,

— testējamās vielas koncentrācija,

— izmantotās celulozes žāvēšanas procedūra,

— izmantotās celulozes ūdens saturs,

— mērījumu rezultāti,

— testēšanas rezultāti ar inertu vielu, ja tā veikta,

— aprēķinātais vidējais spiediena paaugstināšanās laiks,

— atkāpes no minētās metodes un to iemesli,

— papildu informācija vai piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA ([1])

Testēšanas rezultātus novērtē, ņemot vērā:

a) vai notiek testējamās vielas un celulozes maisījuma pašaizdegšanās; un

b) vidējā spiediena paaugstināšanās laika no 690 kPa līdz 2 070 kPa salīdzinājumu ar standartvielai(-ām) noteikto.

Šķidrums uzskatāms par oksidētāju, ja:

a) notiek vielas maisījuma ar celulozi masas attiecībā 1:1 pašaizdegšanās, vai

b) vielas, kuru maisījumiem ar celulozi masas attiecībā 1:1 testējot vidējais spiediena paaugstināšanās laiks ir vienāds vai mazāks nekā 65 masas % no slāpekļskābes ūdens šķīduma un celulozes (1:1 pēc masas) maisījumam noteiktā.

Lai neiegūtu šķietami pozitīvus rezultātus, rezultātu interpretācijai ņem vērā arī rezultātus, kas iegūti, vielu testējot maisījumā ar inertu vielu.

([1]) Izmantojot vairākas standartvielas, par rezultātu interpretāciju saskaņā ar ANO transporta noteikumiem skatīt izmantotās literatūras sarakstā (1).

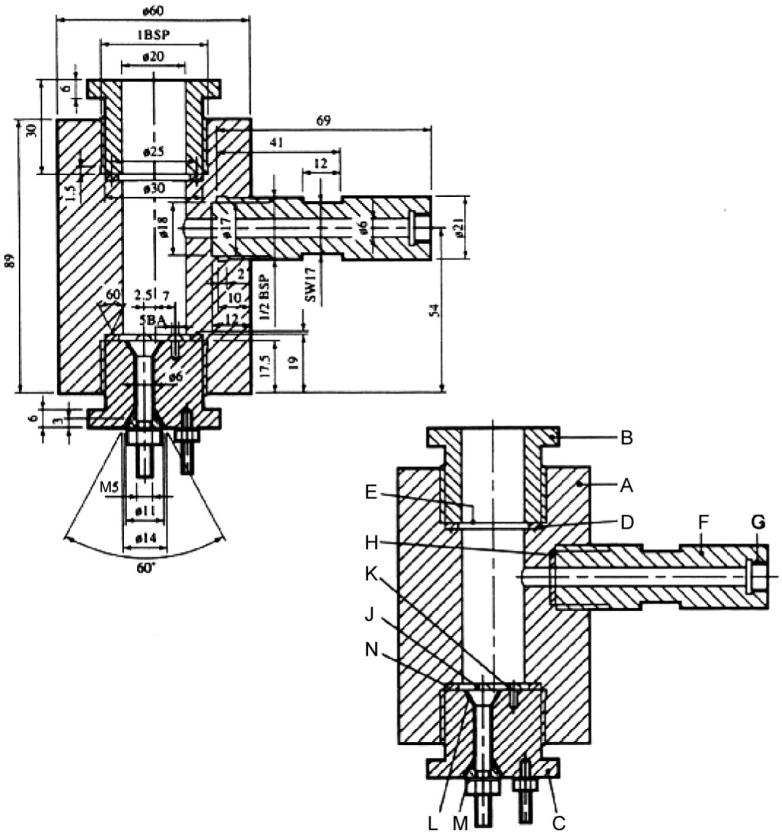
▼B

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

1. attēls

Spiedtvertne

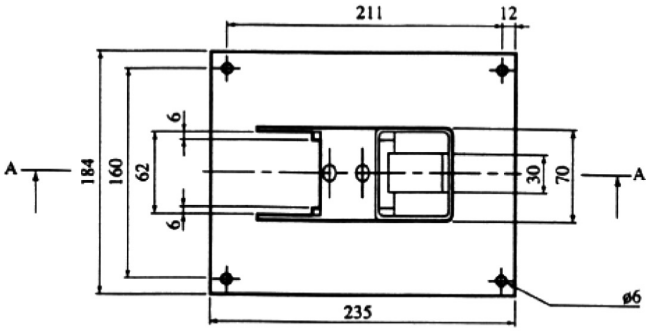


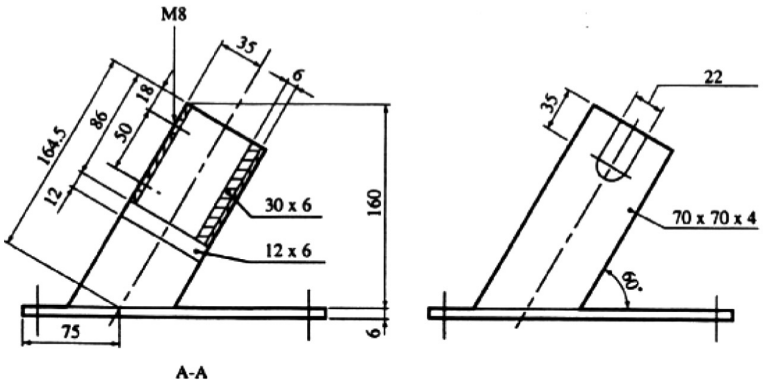
(A) spiedtvertnes korpuss	(B) plīstoša pārraujamā diska fiksācijas ventilis	(C) aizdedzināšanas ventilis
(D) mīksta svina paplāksne	(E) pārraujamais disks	(F) īscaurule
(G) spiediena devēja stiprinājums	(H) paplāksne	(J) izolētais elektrods
(K) iezemētais elektrods	(L) izolācija	(M) tērauda konuss
(N) paplāksni deformējošā rieva		

▼B

2. attēls

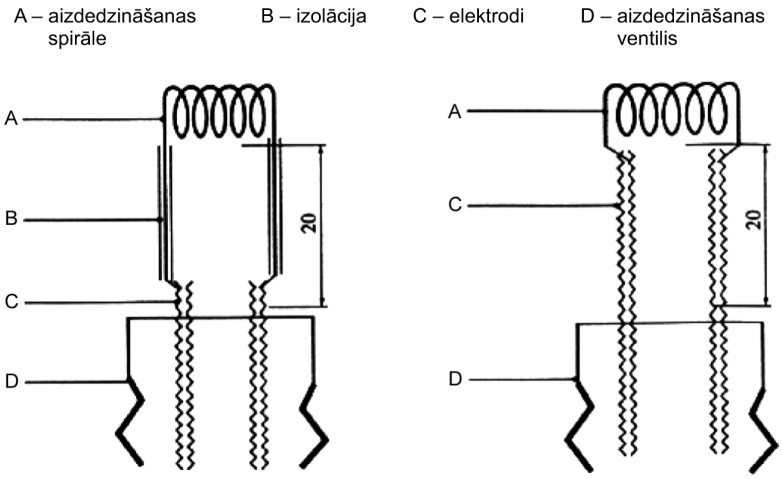
Statīvs





3. attēls

Aizdedzināšanas sistēma



Piezīme. Var izmantot jebkuru no abām konfigurācijām.

▼M1

A.22. **GARUMU SVĒRTAIS ĢEOMETRISKAIS VIDĒJAIS ŠĶIEDRU DIAMETRS**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šī metode apraksta Garumu svērtā ģeometriskā vidējā šķiedru diametra (GSĢVD) mērīšanas procedūru mākslīgām minerālajām šķiedrām (MMŠ). Sakarā ar to, ka kopumam noteiktais GSĢVD ar 95 % varbūtību atrodas 95 % ticamības līmeņu starpā (GSĢVD ± divas standartkļūdas), tad ziņojumā norādītā vērtība (testa vērtība) būs zemākais parauga 95 % ticamības līmenis (t. i., GSĢVD – 2 standartkļūdas). Šī metode pamatojas uz *HSE* nozares procedūras projekta redakciju (1994.gada jūnijs), kas apstiprināta *ECFIA* un *HSE* sanāksmē Česterā 26.9.1993. un izstrādāta otrajam starplaboratoriju izmēģinājumam un pamatojoties uz to (1,2). Šī mērījumu metode var tikt izmantota, lai raksturotu šķiedru diametru nesakārtotā stāvoklī esošām vielām vai produktiem, kas satur MMŠ, ieskaitot ugunsizturīgas keramikas šķiedras (UKŠ), mākslīgas stikla šķiedras (MSŠ), kristāliskās un polikristāliskās šķiedras.

Svēršana pēc garumiem ir līdzeklis kā kompensēt paraugu ņemšanas vai materiāla apstrādes nodarītā garu šķiedru pārrāvuma ietekmi uz diametra sadalījumu. Ģeometriskos statistiskos datus (ģeometriskos vidējos) izmanto, lai novērtētu MMŠ diametru izmēru sadalījumu, jo šiem diametriem parasti ir izmēru sadalījums, kas aproksimējamas uz logaritmisko normālo.

Gan garuma, gan diametra mērīšana ir nogurdinošs un darbietilpīgs darbs, bet ja mēra tikai tās šķiedras, kas pieskaras bezgalīgai tievai līnijai SEM redzes laukā, tad dotās šķiedras izvēles varbūtība ir proporcionāla tās garumam. Tā kā minētais ņem vērā garumu garuma svēršanas aprēķinos, tad vienīgais mērījums, kas ir nepieciešams, ir diametrs, bet GSĢVD-2SE var aprēķināt kā aprakstīts turpmāk.

1.2. DEFINĪCIJAS

Daļiņa: objekts ar garuma pret platumu attiecību mazāku par 3:1.

Šķiedra: objekts ar garuma pret platumu attiecību (aspekta attiecība) vismaz 3:1.

1.3. PIELIETOJUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šī metode ir izstrādāta, lai apskatītu diametru sadalījumu, kurās vidēji diametri sastāda no 0,5 μm līdz 6 μm. Lielākus diametrus var izmērīt, izmantojot mazākus SEM palielinājumus, bet metodes pielietojamība smalkākām šķiedru sadalījumam pakāpeniski samazinās, tāpēc ieteicams pielietot TEM (transmisijas elektronisko mikroskopu), ja vidējais diametrs ir mazāks par 0,5 μm.

▼M1

1.4. TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

No šķiedru paklāja vai vaļīgām šķiedrām ņem kādu reprezentatīvu serdes paraugu skaitu. Vaļīgām šķiedrām samazina garumu, pielietojot sasmalcināšanas procedūru un attiecīgi sagatavoto reprezentatīvo paraugu disperģē ūdenī. Alikvotas ekstrahē un filtrē caur polikarbonāta filtru ar 0,2 μm lielām porām un sagatavo pētīšanai ar skenēšanas elektroniskās mikroskopijas (SEM) metodi. Šķiedru diametrus mēra pie attēla palielinājuma ×10 000 vai vairāk ([1]), izmantojot līnijas šķērsojuma metodi, iegūstot nesagrozītu vidējā diametra novērtējumu. Zemāko 95 % ticamības intervālu (pamatojoties uz vienas puses testu) aprēķina, lai novērtētu mazāko materiāla šķiedras ģeometriskā vidējā diametra vērtību.

1.5. TESTEŠANAS METODES APRAKSTS

1.5.1. **Drošība/piesardzības pasākumi**

Jāsamazina personu ekspozīcija gaisā lidojošām šķiedrām un jāizmanto velkmes skapis vai kamera ar cimdiem, strādājot ar sausām šķiedrām. Periodiski jāpārbauda personu ekspozīcija, lai novērtētu aizsardzības metožu efektivitāti. Strādājot ar MMŠ, jāvalkā vienreizējas lietošanas cimdi, lai samazinātu ādas kairinājumu un novērstu abpusēju piesārņošanu.

1.5.2. **Aparatūra/iekārta**

— Prese un presforma, kas spēj nodrošināt 10 MPa.

— Polikarbonāta filtri ar kapilārporām 0,2 μm (filtra diametrs 25 mm).

— Celulozes estera membrānas filtrs ar 5 μm porām, kas izmantojams kā palīgfiltrs.

— Stikla ierīce filtrēšanai (vai vienreizējas lietošanas filtrēšanas sistēmas), kas paredzēta 25 mm diametra filtram (piem., Millipore stikla komplekts mikroanalīzei, tips XX10 025 00).

— Svaigs destilēts ūdens, kas nofiltrēts caur filtru ar 0,2 μm lielām porām, lai atdalītu mikroorganismus.

— Pārklājums uzsmidzinātājs ar zelta vai zelta/pallādija anodu.

— Skenējošais elektronu mikroskops ar izšķirtspēju līdz 10 nm un palielinājumu x10 000.

— Dažādi piederumi: lāpstiņas, 24. tipa skalpelis, pincete, SEM lampas, oglekļa līme vai oglekļa līmlente, sudraba putekļi.

— Ultraskaņas zonde vai galda ultraskaņas vanna.

— Rīks serdes paraugu ņemšanai vai parauga ņemšanas urbis serdes paraugu ņemšanai no MMŠ paklāja.

([1]) Šī palielinājuma vērtība norādīta 3 μm šķiedrām, 6 μm šķiedrām būtu piemērotāks × 5 000 palielinājums.

▼M1

1.5.3. **Testa procedūra**

1.5.3.1. *Paraugu ņemšana*

Paklāju un segu gadījumā šķērsgriezuma paraugu ņemšanai jāizmanto 25 mm rīks serdes paraugu ņemšanai vai parauga ņemšanas urbis. Paraugus ņem vienādās atstarpēs maza paklāja gabala platumā vai ņem pēc nejaušības principa izvēlētās vietās, ja rīcībā ir garāki paklāja gabali. Tos pašus piederumus var izmantot, ņemot paraugus pēc nejaušības principa no vaļīgām šķiedrām. Ja iespējams, jāņem seši paraugi, lai atspoguļotu nesakārtotā materiāla telpisko neviendabīgumu.

Seši serdes paraugi jāsasmalcina 50 mm diametra presformā pie 10 MPa. Materiālu samaisa ar lāpstiņu un atkārtoti saspiež pie 10 MPa. Pēc tam materiālu izņem no presformas un glabā noslēgtā stikla traukā.

1.5.3.2. *Paraugu sagatavošana*

Ja nepieciešams, no organiskajām saistvielām var atbrīvoties, ievietojot šķiedru krāsnī pie 450 °C aptuveni uz vienu stundu.

Paraugs jānoskalda un jāsadala četrās daļas (tas jādara putekļu aizsargkamerā).

Mazu parauga daudzumu (< 0,5 g) pievieno ar lāpstiņu 100 ml svaiga destilēta ūdens, kas nofiltrēts caur 0,2 μm membrānas filtru (var izmantot alternatīvus augstākās tīrības ūdens avotus, ja šo avotu atbilstība ir pierādīta). Rūpīgi disperģē, pielietojot ultraskaņas zondi ar jaudu 100 W, zondi noregulējot tā, ka notiek kavitācija. (Ja zondes nav pieejama, jāpielieto šāda metode: nepārtraukti sakrata un apgroza 30 sekunžu laikā; apstrādā ar ultraskaņu galda ultraskaņas vannā 5 minūšu laikā; pēc tam atkal sakrata un apgroza turpmāko 30 sekunžu laikā).

Tūlīt pēc šķiedras dispērģēšanas jāņem vairākas alikvotas (piem., trīs alikvotas pa 3, 6 un 10 ml) ar platmutes pipeti.

Katrai alikvotai veic vakuuma filtrēšanu caur 0,2 μm polikarbonāta filtru ar 5 μm lielu poru MEC palīgfiltru, izmantojot 25 mm stikla filtra piltuvi ar cilindrisku trauku. Aptuveni 5 ml nofiltrētā destilēta ūdens jāielej piltuvē un alikvotu lēnām pilina ūdenī ar pipetes palīdzību, turot pipetes galu zem meniska. Pēc pilināšanas pipete un trauks rūpīgi jānoskalo, jo tievām šķiedrām ir tendence novietoties uz virsmas.

Piesardzīgi noņem filtru un atdala no palīgfiltra, pēc tam ievieto traukā žāvēšanai.

▼M1

Nogriež ceturtdaļu vai pusi no nofiltrētās nogulsnes filtra, izmantojot 24.tipa skalpeli ar šūpojošo kustību. Nogriezto daļu piesardzīgi piestiprina pie SEM galviņas ar oglekļa līmlenti vai oglekļa līmi. Sudraba putekļus jāuzklāj vismaz trīs vietās, lai uzlabotu elektrisko kontaktu filtra un galviņas malās. Kad līme/sudraba putekļi ir izžuvuši, jāuzsmidzina aptuveni 50 nm bieza zelta vai zelta/pallādija kārta uz nogulsnes virsmas.

1.5.3.3. *SEM kalibrēšana un darbība*

1.5.3.3.1. Kalibrēšana

SEM kalibrēšana jāpārbauda vismaz vienu reizi nedēļā (ideāli būtu reizi dienā) ar sertificētā kalibrēšanas režģa palīdzību. Kalibrēšana jāārbauda pēc sertificētā etalona un ja izmērītā vērtība (SEM) neatbilst ± 2 % no sertificētās vērtības, tad SEM kalibrēšana jāregulē un jāpārbauda atkārtoti.

SEM jābūt spējīgam izšķirt vismaz minimālo saskatāmu diametru 0,2 μm, izmantojot reālo parauga matricu pie palielinājuma × 2 000.

1.5.3.3.2. Darbība

SEM jāpielieto pie palielinājuma 10 000 ([1]) apstākļos, kas nodrošina labu izšķiršanu ar pieņemamu attēlu pie lēniem skenēšanas ātrumiem, piemēram, 5 sekundes uz kadru. Kaut gan ekspluatācijas prasības dažādiem SEM var būt dažādas, parasti labākas redzamības un izšķiršanas nodrošināšanai relatīvi mazu atomsvaru materiālu gadījumā jāpielieto paātrinājuma spriegumi 5–10 keV ar mazu punktu izmēru uzstādīšanu un īsu darba attālumu. Veicot lineāro pārskatīšanu, jāizmanto 0^{o} slīpums, lai minimizētu atkārtotu nostādīšanu fokusā, vai, ja SEM ir centrētā režīmā, jāizmanto pret centru mērāmais darba attālums. Mazāku palielinājumu var izmantot, ja materiāls nesatur mazas (pēc diametra) šķiedras un šķiedru diametri ir lieli (> 5 μm)

1.5.3.4. *Izmēru noteikšana*

1.5.3.4.1. Pētījums pie maza palielinājuma, novērtējot paraugu

Paraugs jāpēta vispirms pie maza palielinājuma, meklējot lielu šķiedru sablīvēšanās pierādījumus un novērtējot šķiedras blīvumu. Pārmērīgas sablīvēšanās gadījumā ieteicams sagatavot jaunu paraugu.

Lai nodrošinātu statistisko precizitāti, jāmēra minimāls šķiedru daudzums, turklāt ir ieteicams liels šķiedru blīvums, jo tukšu lauku pētīšana ir laikietilpīga un neveicina analīzi. Tomēr ja filtrs ir pārblīvēts, tad grūti izmērīt visas mērāmās šķiedras, jo lielākās šķiedras var aizsegt mazākās un tās var tikt nepamanītas.

([1]) Attiecībā uz 3 μm šķiedrām, skatīt iepriekšējo piezīmi.

▼M1

GSĢVD pārvērtēšanas tendence iespējama gadījumā, ja šķiedru blīvums pārsniedz 150 šķiedras uz milimetru lineārās pārskatīšanas. Savukārt, maza šķiedru koncentrācija palielina analīzes laiku un bieži izdevīgāk būtu sagatavot paraugu ar šķiedru blīvumu, kas tuvāks optimālam, nekā turpināt skaitīt uz filtra ar mazu šķiedru koncentrāciju. Optimālam šķiedru blīvumam jādod vidēji viena vai divas saskaitāmās šķiedras uz redzeslauku pie 5 000 palielinājuma. Tomēr optimālais blīvums ir atkarīgs no šķiedru izmēra (diametra), tāpēc nepieciešams, lai operators pamatotos uz profesionālu pieredzi, lai noteiktu, vai šķiedru blīvums ir vai nav tuvs optimālam.

1.5.3.4.2. Šķiedru diametra svēršana attiecībā pret garumiem

Jāskaita tikai tās šķiedras, kas pieskaras (vai šķērso) bezgalīgo tievo līniju SEM ekrānā. Šim nolūkam jānovelk horizontāla (vai vertikāla) līnija caur ekrāna centru.

Alternatīva varētu būt viena punkta izmantošana ekrāna centrā un nepārtrauktas skenēšanas uzsākšana vienā virzienā filtrā. Jāmēra un jāreģistrē diametrs katrai šķiedrai ar garuma pret platumu attiecību, kas ir lielāka par 3:1, un kas pieskaras vai šķērso šo punktu.

1.5.3.4.3. Šķiedru izmēru noteikšana

Ieteicams izmērīt vismaz 300 šķiedras. Katru šķiedru mēra tikai vienu reizi krustošanās punktā ar punktu vai līniju, kas novilkta attēlā (vai krustošanās punkta tuvumā, ja šķiedras malas ir neskaidras). Ja gadās šķiedras ar neregulāriem šķērsgriezumiem, tad jāveic mērījums, kas atspoguļotu vidējo šķiedru diametru. Jāievēro piesardzība, nosakot malas un mērot īsāko atstarpi starp šķiedru malām. Izmēru noteikšanu var veikt līnijās vai ārlīnijās, izmantojot saglabātus attēlus vai fotogrāfijas. Ieteicams pielietot pusautomātiskas attēla mērīšanas sistēmas, kas datus lejupielādē tieši izklājlapā, jo šīs sistēmas ļauj ietaupīt laiku, novērš kopēšanas kļūdas un var automatizēt aprēķinus.

Garu šķiedru gali jāapskata pie maza palielinājuma, lai pārliecinātos, ka tie nav ielocījušies atpakaļ mērāmajā redzes laukā un tiek izmērīti tikai vienu reizi.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Parasti šķiedru diametriem nav normālā sadalījuma. Tomēr, veicot logaritmisko pārveidošanu, var iegūt sadalījumu, kas aproksimējama uz normālo.

Aprēķina n šķiedru diametru (D) naturālā logaritma (lnD) aritmētisko vidējo (vidējais lnD) un standartnovirzi (SD_{lnD}).

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standartnovirzi dala ar mērījumu skaita (n) kvadrātsakni, iegūstot standartkļūdu (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Divkāršoto standartkļūdu atskaita no vidējā un aprēķina šo vērtību eksponenciāli (vidējo atskaitot divkāršoto standartkļūdu), iegūstot ģeometrisko vidējo (formulā apzīmēts kā LWGMD) mīnuss divas ģeometriskās standartkļūdas.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **ZIŅOJUMS**

TESTA PĀRSKATS

Testa pārskatā jāiekļauj vismaz šāda informācija:

— GSĢVD-2SE vērtība.

— Attiecīgs pamatojums jebkādām atkāpēm, it īpaši tādām, kas varētu ietekmēt rezultātu precizitāti un pareizību.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and 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. SADALĪJUMA KOEFICIENTS (1-OKTANOLS/ŪDENS): LĒNĀS MAISĪŠANAS METODE

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 123 (*TG*) (2006). 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficienta (P_{OW}) vērtības līdz log P_{OW} 8,2 ir precīzi noteiktas ar lēnās maisīšanas metodi (1). Tāpēc šī eksperimentālā pieeja ir piemērota izteikti hidrofobisku vielu P_{OW} tiešai noteikšanai.

2. Citas metodes 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficienta (P_{OW}) noteikšanai ir "kolbu kratīšanas metode" (2) un P_{OW} noteikšana pēc apgrieztās fāzes *HPLC* aiztures dinamikas (3). "Kolbu kratīšanas metode" mēdz radīt artefaktus, un tā cēlonis ir oktanola mikropilienu nonākšana ūdens fāzē. Ja P_{OW} vērtības palielinās, šo pilienu klātbūtne ūdens fāzē noved pie tā, ka testējamās vielas koncentrācija ūdenī aizvien vairāk tiek novērtēta par augstu. Tāpēc to var izmantot tikai vielām ar log $P_{OW} < 4$. Ar otro metodi, izmantojot stabilus datus par tieši noteiktām P_{OW} vērtībām, kalibrē sakarību starp *HPLC* aiztures dinamiku un noteiktajām P_{OW} vērtībām. Agrāk projekta veidā bija pieejami ESAO norādījumi par jonizējamu vielu 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu noteikšanu (4), bet tos vairs neizmantos.

3. Šī testēšanas metode ir izstrādāta Nīderlandē. Šeit aprakstīto metožu precizitāte ir validēta un optimizēta ar starplaboratoriju salīdzinošu testēšanu veiktā validējošā pētījumā, kurā piedalījās 15 laboratorijas (5).

SĀKOTNĒJI APSVĒRUMI

Nozīme un izmantošana

4. Inertām organiskajām vielām ir konstatētas ļoti būtiskas sakarības starp 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficientiem (P_{OW}) un šo vielu bioakumulāciju zivīs. Turklāt ir pierādīts, ka P_{OW} korelē ar toksiskumu zivīm, kā arī ar ķīmisko vielu sorbciju uz tādām cietvielām kā augsne un nogulumieži. Plašs pārskats par šīm sakarībām sniegts norādītajā avotā (6).

5. Ir konstatēts daudz dažādu sakarību starp 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu un citām vielu īpašībām, kas attiecas uz vides toksikoloģiju un ķīmiju. Rezultātā 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficients ir kļuvis par vienu no galvenajiem parametriem, novērtējot ķīmisko vielu radīto risku videi, kā arī prognozējot ķīmisko vielu apriti vidē.

Tvērums

6. Uzskata, ka lēnās maisīšanas eksperimentā no 1-oktanola pilieniem ūdens fāzē mazāk veidojas mikropilieni. Tas novērš ietekmi, ko rada testējamās vielas molekulu piesaistīšanās šādiem pilieniem, un attiecīgi ūdens koncentrācija netiek novērtēta pārāk augstu. Tāpēc lēnās maisīšanas metode ir īpaši piemērota P_{OW} noteikšanai vielām, kuru paredzamā log P_{OW} vērtība ir 5 un augstāka un kurām "kolbu kratīšanas metode" (2) var sniegt kļūdainus rezultātus.

▼M4

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

7. Vielas sadalījuma koeficients starp ūdeni un lipofilu šķīdinātāju (1-oktanolu) raksturo ķīmiskās vielas līdzsvara sadalījumu starp abām fāzēm. Sadalījuma koeficientu starp ūdeni un 1-oktanolu (P_{OW}) definē kā attiecību starp divām testējamās vielas līdzsvara koncentrācijām – ar ūdeni piesātinātā 1-oktanolā (C_O) un ar 1-oktanolu piesātinātā ūdenī (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kā koncentrāciju attiecība šis koeficients ir bezdimensijas lielums. Visbiežāk to izsaka kā decimāllogaritmu (log P_{OW}). P_{OW} ir atkarīgs no temperatūras, un ziņojumā ietvertajos datos ir jānorāda temperatūra mērījumu laikā.

METODES PRINCIPS

8. Lai noteiktu sadalījuma koeficientu, ūdenim, 1-oktanolam un testējamajai vielai ļauj sasniegt savstarpēja līdzsvara stāvokli nemainīgā temperatūrā. Pēc tam nosaka testējamās vielas koncentrāciju abās fāzēs.

9. Eksperimentālās grūtības, kas kolbu kratīšanas testā saistītas ar mikropilienu veidošanos, var samazināt ar šeit ieteikto lēnās maisīšanas testu. Lēnās maisīšanas testā ūdenim, 1-oktanolam un testējamajai vielai ļauj nostāvēties termostatējamā reaktorā ar maisītāju. Apmaiņu starp fāzēm paātrina ar maisīšanu. Ar maisīšanu tiek nodrošināta neliela turbulence, kas uzlabo 1-oktanola un ūdens apmaiņu, novēršot mikropilienu veidošanos (1).

TESTA PIEMĒROJAMĪBA

10. Tā kā citu vielu klātbūtne varētu ietekmēt testējamās vielas aktivitātes koeficientu, testējamā viela ir jātestē kā tīra viela. 1-oktanola/ūdens sadalījuma testā ir jāizmanto viela ar tirdzniecībā pieejamo augstāko tīrību.

11. Šī metode piemērojama tīrām vielām, kas nedisociējas vai neasociējas un kam nepiemīt būtiska starpfāžu aktivitāte. To var izmantot, lai noteiktu šādu vielu un maisījumu 1-oktanola/ūdens sadalījuma attiecību. Ja metodi izmanto maisījumiem, noteiktās 1-oktanola/ūdens sadalījuma attiecības ir atkarīgas no testējamā maisījuma ķīmiskā sastāva un no izmantotās ūdens fāzes elektrolītu sastāva. Ar nosacījumu, ka tiek veikti papildu pasākumi, metodi var piemērot arī savienojumiem, kas disociējas vai asociējas (12. punkts).

12. Tā kā ūdenī un 1-oktanolā, kas iesaistīti disociējošos vielu (piemēram, organisko skābju un fenolu, organisko bāzu un metālorganisko vielu) 1-oktanola/ūdens sadalījumā, ir vairāki sadalījuma līdzsvari, 1-oktanola/ūdens sadalījuma attiecība ir nosacījuma konstante, kura ir lielā mērā atkarīga no elektrolītu sastāva (7) (8). Tāpēc 1-oktanola/ūdens sadalījuma attiecības noteikšanai ir vajadzīgs, lai pH un elektrolītu sastāvs testā tiktu regulēts un arī norādīts ziņojumā. Šo sadalījuma attiecību izvērtēšanā jāizmanto ekspertu atzinumi. Izmantojot disociācijas konstantes(-šu) vērtību, jāizraugās tādas piemērotas pH vērtības, lai sadalījuma attiecība tiktu noteikta katram jonizācijas stāvoklim. Testējot metālorganiskos savienojumus, jāizmanto buferšķīdumi, kas nav kompleksveidotāji (8). Ņemot vērā esošās zināšanas par ūdens ķīmiju (kompleksu veidošanās konstantēm, disociācijas konstantēm), jāizraugās tādi eksperimenta apstākļi, lai varētu aprēķināt testējamās vielas sastāvu ūdens fāzē. Visos eksperimentos jābūt vienādam jonu spēkam, ko panāk, izmantojot fona elektrolītu.

▼M4

13. Sarežģījumi testā var rasties, ja tiek testētas vielas ar zemu šķīdību ūdenī vai augstu P_{OW}, jo tādā gadījumā koncentrācijas ūdenī ir ļoti zemas un ir grūti tās precīzi noteikt. Šī testēšanas metode sniedz norādījumus, kā risināt šo problēmu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

14. Ķīmiskajiem reaģentiem jābūt analītiski tīriem vai vēl tīrākiem. Ieteicams lietot neiezīmētas testējamās vielas ar zināmu ķīmisko sastāvu un, vēlams, vismaz 99 % tīrību vai radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas ar zināmu ķīmisko sastāvu un radioķīmisko tīrību. Ja iezīmēšanai izmantoti izotopi ar īsu pussabrukšanas periodu, dati attiecīgi jākoriģē. Ja iezīmēšanai izmantoti izotopi ar īsu pussabrukšanas periodu, jāveic attiecīga korekcija. Izmantojot iezīmētas testējamās vielas, jāizmanto attiecīgajai ķīmiskajai vielai specifiska analītiskā metode, lai nodrošinātu, ka izmērītā radioaktivitāte ir tieši saistīta ar testējamo vielu.

15. Log P_{OW} vērtību var aptuveni aprēķināt ar komerciāli pieejamu programmatūru log P_{OW} aplēšanai vai arī pēc attiecības starp vielas šķīdību vienā un otrā šķīdinātājā.

16. Pirms veic lēnās maisīšanas eksperimentu, lai noteiktu P_{OW}, par testējamo vielu jābūt pieejamai šādai informācijai:

a) struktūrformula;

b) piemērotas analītiskās metodes, ar ko var noteikt vielas koncentrāciju ūdenī un 1-oktanolā;

c) jonizējamu vielu disociācijas konstante(-es) (ESAO norādījumi 112 (9));

d) šķīdība ūdenī (10);

e) abiotiskā hidrolīze (11);

f) pilnīgā bionoārdāmība (12);

g) tvaika spiediens (13).

METODES APRAKSTS

Aprīkojums un aparatūra

17. Vajadzīgs laboratorijas standartaprīkojums, it sevišķi šāds:

— ūdens fāzes maisīšanai izmantojamie magnētiskie maisītāji un ar teflonu pārklātie magnētiskie maisīšanas stienīši,

— analītiskie instrumenti, kas piemēroti testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai prognozētajās koncentrācijās,

— maisīšanas trauks ar krānu trauka apakšā; atkarībā no testējamā savienojuma log P_{OW} aplēsēm un kvalitatīvās noteikšanas robežas (*LOD*) jāapsver, vai, lai varētu iegūt ķīmiskajai ekstrakcijai un analīzei pietiekamu daudzumu ūdens, nav jāizmanto reakcijas trauks, kuram ir tāda pati ģeometriskā forma un kura tilpums ir virs viena litra; tad varēs iegūt augstākas vielu koncentrācijas ūdens ekstraktā un tātad drošākus analītiskās noteikšanas rezultātus; 1. papildinājumā sniegta tabula ar aplēsēm par minimālo vajadzīgo tilpumu, savienojuma *LOD*, tā log P_{OW} un tā šķīdību ūdenī; tabulas pamatā ir *Pinsuwan et al*. (14) sniegtā log P_{OW} sakarība ar attiecību starp šķīdību oktanolā un ūdenī:

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

kur:

$SR = S_{oct}/S_w$ (molārā koncentrācija),

un *Lyman* (15) sniegtā sakarība, pēc kuras prognozē šķīdību ūdenī; šķīdība ūdenī, kas aprēķināta pēc 1. papildinājumā dotā vienādojuma, jāuzskata par pirmo aplēsi; jāatzīmē, ka lietotājs šķīdību ūdenī var aplēst, brīvi izmantojot jebkādu sakarību, ja tiek uzskatīts, ka tā labāk atspoguļo sakarību starp hidrofobitāti un šķīdību; piemēram, cietiem savienojumiem šķīdības prognozēšanā ir ieteicams izmantot arī kušanas temperatūru; ja tiek izmantots pārveidots vienādojums, ir jāpārliecinās, ka vienādojums, pēc kura rēķina šķīdību oktanolā, joprojām ir derīgs; 2. papildinājumā ir dots shematisks zīmējums, kurā attēlots stikla apvalkā ievietots maisīšanas trauks ar aptuvenu tilpumu viens litrs; 2. papildinājumā attēlotā trauka izmēru attiecības ir izrādījušās ļoti ērtas un būtu jāsaglabā arī tad, ja tiek izmantota citu izmēru aparatūra,

— būtiski ir tas, kādā veidā lēnās maisīšanas testā saglabā nemainīgu temperatūru.

18. Traukiem jābūt izgatavotiem no inerta materiāla, lai adsorbcija uz trauku virsmām būtu niecīga.

Testējamo šķīdumu sagatavošana

19. P_{OW} jānoteic, izmantojot 1-oktanolu ar augstāko komerciāli pieejamo tīrību (vismaz + 99 %). 1-oktanolu ieteicams attīrīt, izmantojot ekstrakciju ar skābi, bāzi un ūdeni un pēc tam žāvēšanu. Papildus tam 1-oktanola attīrīšanā var izmantot destilāciju. Testējamo vielu standartšķīdumu sagatavošanā ir jāizmanto attīrīts 1-oktanols. Ūdenim, ko izmanto P_{OW} noteikšanā, jābūt destilētam stikla vai kvarca aparātā vai iegūtam attīrīšanas sistēmā, vai arī var izmantot ūdeni ar *HPLC* klases tīrību. Destilēts ūdens ir jāfiltrē caur 0,22 μm filtru, un ir jāizmanto arī tukšie paraugi, lai pārliecinātos, ka koncentrētajos ekstraktos nav piemaisījumu, kas varētu interferēt ar testējamo vielu. Ja izmanto stikla šķiedru filtru, tas jāsterilizē, vismaz trīs stundas to karsējot 400 °C temperatūrā.

20. Pirms eksperimenta abus šķīdinātājus savstarpēji piesātina, pietiekami lielā traukā tos līdzsvarojot. To izdara, divfāžu sistēmu divas dienas lēni maisot.

21. Attiecīgi izraugās testējamās vielas koncentrāciju, un vielu šādā koncentrācijā izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni). Vielas šķīdumiem 1-oktanolā un ūdenī jānosaka 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficients. Tāpēc testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt 70 % no tās šķīdības ar maksimālo koncentrāciju 0,1 M jebkurā no fāzēm (1). 1-oktanola šķīdumos, ko izmanto eksperimentā, nedrīkst būt neizšķīdušu suspendētu testējamās cietvielas daļiņu.

22. Attiecīgu testējamās vielas daudzumu izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni). Ja log P_{OW} aplēse pārsniedz 5, jāraugās, lai 1-oktanola šķīdumos, ko izmanto eksperimentā, nebūtu suspendētu testējamās cietvielas daļiņu. Šajā nolūkā ar ķīmiskām vielām, kam aplēstā log P_{OW} vērtība ir > 5, rīkojas šādi:

— testējamo vielu izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni),

▼M4

— šķīdumu nostādina, līdz suspensija nogulsnējas; nostādināšanas laikā seko testējamās vielas koncentrācijai,

— kad 1-oktanola šķīdumā mērītās koncentrācijas ir stabilizējušās, pamatšķīdumu atšķaida ar attiecīgu daudzumu 1-oktanola,

— izmēra atšķaidītā pamatšķīduma koncentrāciju; ja izmērītā koncentrācija atbilst atšķaidījumam, atšķaidīto pamatšķīdumu var izmantot noteikšanai pēc lēnās maisīšanas paņēmiena.

Paraugu ekstrakcija un analizēšana

23. Testējamās vielas analizēšanai jāizmanto validēta analītiskā metode. Pētniekiem jāsniedz dati, kas pierāda, ka koncentrācija gan ar ūdeni piesātinātā 1-oktanolā, gan arī ar 1-oktanolu piesātinātā ūdens fāzē testa laikā pārsniedz ar analītiskajās procedūrās izmantoto metodi saistīto kvantificēšanas robežu. Gadījumos, kuros nepieciešams izmantot ekstrakcijas metodes, pirms eksperimenta jānosaka testējamās vielas analītiskā atgūstamība no ūdens fāzes un no 1-oktanola fāzes. Analītiskais signāls jākoriģē pēc tukšiem paraugiem un jāraugās, lai nenotiek analīta pārnese no parauga uz paraugu.

24. Pirms analīzes, visticamāk, būs jāveic ūdens fāzes ekstrakcija ar organisku šķīdinātāju, kā arī ekstrakta priekškoncentrēšana, jo hidrofobām testējamām vielām ūdens fāzē ir samērā zema koncentrācija. Tā paša iemesla dēļ ir jāsamazina iespējamās koncentrācijas tukšajiem paraugiem. Šajā nolūkā ir jāizmanto šķīdinātāji ar augstu tīrību, vislabāk šķīdinātāji, kas paredzēti vielu atlieku analīzei. Turklāt, strādājot ar iepriekš rūpīgi sagatavotiem (piemēram, ar šķīdinātājiem mazgātiem vai augstā temperatūrā karsētiem) stikla priekšmetiem, vieglāk ir izvairīties no piesārņojuma izplatīšanās.

25. Gaidāmās log P_{OW} vērtības aplēsi var iegūt ar aplēšanas programmu vai pēc ekspertu vērtējuma. Ja šī vērtība ir augstāka par 6, rūpīgi jākontrolē korekcijas pēc tukšajiem paraugiem un analīta iespējamā pārnese. Tāpat, ja log P_{OW} aplēse pārsniedz 6, atgūstamības koriģēšanā obligāti jāizmanto kāds surogātstandarts, lai varētu sasniegt augstus priekškoncentrēšanas koeficientus. Komerciāli pieejamas vairākas P_{OW} aplēšanas datorprogrammas ([1]), piemēram, *Clog P* (16), *KOWWIN* (17), *ProLogP* (18) un *ACD log P* (19). Aplēšanas pieeju apraksti atrodami avotos, kas norādīti atsaucēs (20–22).

26. To, kādās kvantificēšanas robežās (*LOQ*) iespējams noteikt testējamas vielas daudzumu 1-oktanolā un ūdenī, novērtē, izmantojot atzītas metodes. Ar metodi saistīto kvantificēšanas robežu aptuveni var noteikt kā to koncentrāciju ūdenī vai 1-oktanolā, kurai signāla un trokšņa attiecība ir 10. Jāizraugās piemērota ekstrakcijas un priekškoncentrēšanas metode, kā arī jānosaka analītiskā atgūstamība. Lai analītiskajā noteikšanā iegūtu vajadzīgā lieluma signālu, izraugās piemērotu priekškoncentrēšanas koeficientu.

([1]) Šī informācija ir sniegta tikai lietotāju ērtībām. Ja iespējams pierādīt, ka tādus pašus rezultātus nodrošina kādas citas datorprogrammas, kas līdzvērtīgas minētajām, var izmantot arī tās.

▼M4

27. Pamatojoties uz analītiskās metodes parametriem un gaidāmajām koncentrācijas vērtībām, aptuveni nosaka, cik liels paraugs vajadzīgs, lai precīzi noteiktu savienojuma koncentrāciju. Nedrīkst izmantot tādus ūdens paraugus, kas ir pārāk mazi, lai iegūtu pietiekamu analītisko signālu. Tāpat jāizvairās no pārāk lielu ūdens paraugu izmantošanas, jo tad ūdens varētu pietrūkt minimālajam nepieciešamajam analīžu skaitam (n = 5). 1. papildinājumā ir norādīts parauga minimālais tilpums atkarībā no trauka tilpuma, testējamās vielas *LOD* un testējamās vielas šķīdības.

28. Testējamo vielu kvantificē, mērījumu rezultātus salīdzinot ar attiecīgajam savienojumam atbilstošām kalibrēšanas līknēm. Iekavās aiz analizēto paraugu koncentrācijām jānorāda standartu koncentrācijas.

29. Tādu testējamo vielu šķīdumi, kurām log P_{OW} aplēse ir augstāka par 6, pirms ekstrakcijas jāpastiprina, tiem pievienojot surogātstandartu, lai reģistrētu zudumus, kas rodas ekstrakcijas un ūdens paraugu priekškoncentrēšanas laikā. Lai varētu precīzi koriģēt atgūstamību, surogātstandartiem jābūt ar tādām pašām vai ļoti līdzīgām īpašībām kā testējamajai vielai. Šajā nolūkā vēlams izmantot ar stabiliem izotopiem iezīmētus attiecīgo vielu analogus (piemēram, deiterētus vai ar ^{13}C iezīmētus). Ja analogus, kas iezīmēti ar stabiliem izotopiem, t. i., ^{13}C vai ^{2}H, nav iespējams izmantot, ar drošiem literatūras datiem jāparāda, ka surogātstandarta fizikālķīmiskās īpašības ir ļoti līdzīgas testējamās vielas īpašībām. Ūdens fāzes šķidruma–-šķidruma ekstrakcijas laikā var veidoties emulsijas. Tās var samazināt, pievienojot sāli un līdz nākamajai dienai nostādinot. Ziņojumā jānorāda paraugu ekstrakcijai un priekškoncentrēšanai izmantotās metodes.

30. No 1-oktanola fāzes iegūtos paraugus pirms analīzes, ja nepieciešams, var atšķaidīt ar piemērotu šķīdinātāju. Turklāt vielām, kurām konstatēta liela atgūstamības izkliede (relatīvā standartnovirze > 10 %), atgūstamības korekcijai ieteicams izmantot surogātstandartus.

31. Ziņojumā jāsniedz sīka informācija par izmantoto analītisko metodi. Tajā jāietver ziņas par ekstrakcijas metodi, priekškoncentrēšanas un atšķaidījuma koeficientiem, instrumentu parametriem, kalibrēšanas procesu, kalibrēšanas diapazonu, testējamās vielas analītisko atgūstamību no ūdens fāzes, atgūstamības korekcijai izmantotajiem surogātstandartiem, tukšo paraugu vērtībām, kā arī noteikšanas un kvantificēšanas robežām.

Testa veikšana

Optimālā 1-oktanola/ūdens tilpuma attiecība

32. Izvēloties ūdens un 1-oktanola tilpumus, jāņem vērā vielas *LOQ* 1-oktanolā un ūdenī, ūdens paraugiem izmantotie priekškoncentrēšanas koeficienti, ņemto 1-oktanola un ūdens fāzes paraugu tilpumi, kā arī gaidāmās koncentrācijas. 1-oktanola tilpums lēnās maisīšanas sistēmā eksperimentam jāizvēlas tāds, lai 1-oktanola slānis būtu pietiekami biezs (> 0,5 cm) un lai 1-oktanola fāzē paraugus varētu ņemt, to nesajaucot.

33. Parasti fāžu attiecība, ko izmanto, testējot savienojumus, kuriem log P_{OW} ir 4,5 un augstāks, ir 20 līdz 50 ml 1-oktanola un 950 līdz 980 ml ūdens viena litra traukā.

▼M4

Testēšanas apstākļi

34. Testēšanas laikā reakcijas trauku termostatē, temperatūras svārstības samazinot līdz mazāk nekā 1 °C. Noteikšana jāveic 25 °C temperatūrā.

35. Eksperimentālā sistēma jāaizsargā no dienasgaismas, testēšanu izdarot tumšā telpā vai arī reakcijas trauku pārklājot ar alumīnija foliju.

36. Eksperiments jāveic no putekļiem tīrā vidē (ciktāl tas iespējams).

37. 1-oktanola un ūdens sistēmu maisa, līdz iestājies līdzsvars. Ievadeksperimentā līdzsvarošanās perioda ilgumu novērtē, veicot lēnās maisīšanas eksperimentu, kurā periodiski ņem ūdens un 1-oktanola paraugus. Starp paraugu ņemšanas reizēm jābūt vismaz piecām stundām.

38. Katru P_{OW} skaitlisko vērtību nosaka pēc vismaz triju neatkarīgu lēnās maisīšanas eksperimentu rezultātiem.

Līdzsvara iestāšanās laika noteikšana

39. Pieņem, ka līdzsvars ir sasniegts, kad 1-oktanola/ūdens koncentrāciju attiecības regresija pret laiku četros laika punktos veido līniju, kuras slīpums ar ticamības līmeni 0,05 būtiski neatšķiras no nulles. Minimālais līdzsvarošanās laiks, pēc kura var sākt paraugu ņemšanu, ir viena diena. Parasti vielām, kuru log P_{OW} aplēse ir zemāka par 5, paraugu ņemšanu var veikt otrajā un trešajā dienā. Hidrofobiskākiem savienojumiem līdzsvarošanas laiku var nākties pagarināt. Savienojumam ar log P_{OW} 8,23 (dekahlorobifenols) līdzsvarošanai pietika ar 144 stundām. Līdzsvaru novērtē, paraugus no tā paša trauka ņemot atkārtoti.

Eksperimenta sākšana

40. Eksperimenta sākumā reakcijas trauku uzpilda ar ūdeni, kas piesātināts ar 1-oktanolu. Jāatvēl pietiekams laiks, lai sasniegtu termostatā iestatīto temperatūru.

41. Reakcijas trauka saturam uzmanīgi pievieno vēlamo daudzumu testējamās vielas (kas izšķīdināta vajadzīgajā daudzumā ar ūdeni piesātināta 1-oktanola). Šis ir ļoti atbildīgs testa posms, jo ir jāizvairās no abu fāžu turbulentas sajaukšanās. Šajā nolūkā 1-oktanola fāzi var lēnām iepilināt ar pipeti, tās galu vēršot pret eksperimenta trauka sienu tuvu ūdens virsmai. Šķidrums noplūdīs pa stikla sienu un izveidos plēvi virs ūdens fāzes. Nedrīkst 1-oktanolu dekantēt tieši kolbā; 1-oktanola pilieni nedrīkst krist tieši ūdenī.

42. Maisīšanu sākot, maisīšanas ātrums jāpalielina pakāpeniski. Ja maisītāja motoru nav iespējams attiecīgi regulēt, varbūt jāizmanto transformators. Maisīšanas ātrums jāiestata tā, lai robežšķirtnē starp ūdeni un 1-oktanolu rastos 0,5 līdz 2,5 cm dziļš virpulis. Maisīšanas ātrums ir jāsamazina, ja virpuļa dziļums pārsniedz 2,5 cm; pretējā gadījumā ūdens fāzē no 1-oktanola pilieniem var izveidoties mikropilieni, kas noved pie testējamas vielas koncentrācijas ūdenī pārvērtēšanas. Ņemot vērā validācijas pētījumu rezultātus, kas iegūti starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas programmā (5), ieteicamais maksimālais maisīšanas ātrums ir 2,5 cm. Tas ir kompromiss: maisot ar šādu ātrumu, fāžu līdzsvars iestājas pietiekami ātri, 1-oktanola mikropilieniem veidojoties ierobežoti.

▼M4

Parauga ņemšana un parauga apstrāde

43. Pirms paraugu ņemšanas maisītājs jāizslēdz un jānogaida, līdz apstājas šķidrumu kustība. Kad paraugu ņemšana pabeigta, maisītāju atkal lēnām palaiž, kā aprakstīts iepriekš, un tad maisīšanas ātrumu pakāpeniski palielina.

44. Ūdens fāzes paraugu ņem no krāna reakcijas trauka apakšā. Pirms tam no krāna izlaiž ūdens "mirušo" tilpumu (kas 2. papildinājumā attēlotajam traukam ir apmēram 5 ml). Ūdens krānā netiek maisīts un tādēļ nav līdzsvarā ar pārējo šķidrumu. Reģistrē paraugu tilpumu un raugās, lai izlaistajā ūdenī esošās testējamās vielas daudzums tiktu ņemts vērā masas bilancē. Iztvaikošanas zudumi iespējami jāsamazina, ļaujot ūdenim mierīgi plūst tādā dalāmajā piltuvē, lai neizjuktu ūdens/1-oktanola slānis.

45. 1-oktanola paraugus iegūst, ar 100 mikrolitru šļirci, kas izgatavota no stikla un metāla, ievelkot nelielu alikvotu (apm. 100 µl) no 1-oktanola slāņa. Jārīkojas rūpīgi, lai neizjauktu fāžu robeža. Ņemtā parauga tilpumu reģistrē. Ar nelielu alikvotu pietiek, jo 1-oktanola paraugu atšķaidīs.

46. Jāizvairās no nevajadzīgas paraugu pārnešanas. Tāpēc parauga tilpums jānosaka gravimetriski. Ūdens paraugiem tas izdarāms, ūdens paraugu ņemot dalāmajā piltuvē, kurā jau iepildīts vajadzīgais daudzums šķīdinātāja.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

47. Saskaņā ar šo testēšanas metodi P_{OW} nosaka, ar pētāmo savienojumu identiskos apstākļos veicot trīs lēnās maisīšanas eksperimentus (trīs eksperimentālas vienības). Regresijai, ko izmanto līdzsvara iegūšanas pierādīšanai, jābūt balstītai uz vismaz četru C_O/C_W noteikšanu rezultātiem secīgos laikos. Tādējādi ir iespējams aprēķināt dispersiju kā katrā eksperimenta vienībā iegūtās vidējās vērtības nenoteiktības mēru.

48. P_{OW} var raksturot ar katrai eksperimenta vienībai iegūto datu dispersiju. Šo informāciju izmanto, lai aprēķinātu P_{OW} kā atsevišķu eksperimenta vienību rezultātu vidējo svērto vērtību. Šajā nolūkā izsvēršanai izmanto eksperimentālo vienību rezultātu dispersijas apgriezto vērtību. Tādējādi dati ar lielām svārstībām (ko izsaka kā dispersiju) un tātad mazāku ticamību mazāk ietekmē rezultātu nekā dati ar nelielu dispersiju.

49. Analoģiski aprēķina svērto standartnovirzi. Tā raksturo P_{OW} mērījuma atkārtojamību. Maza svērtā standartnovirze norāda, ka P_{OW} noteikšanas rezultātiem ir laba atkārtojamība vienā laboratorijā. Datu formāla statistiskā apstrāde ir aprakstīta turpmāk tekstā.

▼M4

Rezultātu apstrāde

Līdzsvara sasniegšanas pierādīšana

50. Testējamās vielas koncentrāciju 1-oktanolā un ūdenī attiecības logaritmu (log (C_O/C_w)) aprēķina katram paraugu ņemšanas laikam. Ķīmiskā līdzsvara sasniegšanu demonstrē ar šīs attiecības un laika sakarības grafiku. Šā grafika plato, ko nosaka vismaz pēc četriem secīgiem laika punktiem, norāda, ka līdzsvars ir sasniegts un ka savienojums ir patiešām izšķīdis 1-oktanolā. Ja tā nav, tests jāturpina, līdz četri secīgi laika punkti veido līniju, kuras slīpums ar ticamības līmeni 0,05 būtiski neatšķiras no nulles, norādot, ka log C_o/C_w nav atkarīgs no laika.

Log P_{OW} aprēķināšana

51. Eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtību aprēķina kā vidējo svērto log C_o/C_w vērtību tai log C_o/C_w un laika sakarības grafika daļai, kurā ir pierādīts fāžu līdzsvars. Vidējo svērto vērtību aprēķina, datus izsverot pēc dispersijas apgrieztās vērtības, lai datu ietekme uz galīgo rezultātu būtu apgriezti proporcionāla datu nenoteiktībai.

Vidējais log P_{OW}

52. Dažādu eksperimentālo vienību vidējo log P_{OW} aprēķina kā vidējo vērtību no atsevišķu eksperimentālo vienību rezultātiem, kas izsvērti pēc to attiecīgajām dispersijām.

Aprēķinus veic pēc formulas:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kur:

$\log P_{OW,i}$ = i-tās eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtība;

$\log P_{OW,Av}$ = individuālā log P_{OW} vidējā svērtā vērtība;

w_i = statistiskais svars, ko piešķir i-tās eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtībai.

Log $P_{OW,i}$ dispersijas apgriezto lielumu izmanto kā w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{OW} vidējās vērtības kļūdu aprēķina kā log C_o/C_w atkārtojamību, ko laikā pēc fāžu līdzsvara sasniegšanas nosaka individuālajām eksperimenta vienībām. To izsaka kā log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) svērto standartnovirzi, kas savukārt ir ar log $P_{OW,Av}$ saistītās kļūdas mērs. Svērto standartnovirzi no svērtās dispersijas ($\text{var}_{\log Pow,Av}$) var aprēķināt šādi:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Ar n apzīmē eksperimentālo vienību skaitu.

▼M4

Testēšanas ziņojums

54. Testēšanas ziņojumā jāsniedz šāda informācija:

Testējamā viela:

— ikdienas nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula (norādot iezīmēto vietu, ja lieto radioaktīvi iezīmētu vielu) un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības (sk. 17. punktu),

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi),

— iezīmētu ķīmisko vielu iezīmes tīrība un molārā aktivitāte (kur piemērojams),

— log P_{ow} provizoriskā aplēse un tās iegūšanai izmantotā metode.

Testēšanas apstākļi:

— pētījumu norises datumi,

— temperatūra eksperimenta laikā,

— 1-oktanola un ūdens tilpums testa sākumā,

— ņemto 1-oktanola un ūdens paraugu tilpumi,

— testa traukos palikušā 1-oktanola un ūdens tilpumi,

— izmantoto testa trauku un maisīšanas apstākļu apraksts (maisīšanas stienīša un testa trauka forma, virpuļa augstums mm un, ja iespējams, maisīšanas ātrums),

— analītiskā metode, kas izmantota, lai noteiktu testējamo vielu, un ar metodi saistītā kvantificēšanas robeža,

— paraugu ņemšanas laiki,

— ūdens fāzes pH un izmantotie buferšķīdumi, ja jonus veidojošām molekulām pH tiek koriģēts,

— atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

— izmantoto analītisko metožu atkārtojamība un jutība,

— noteiktā testējamās vielas koncentrācija 1-oktanolā un ūdenī atkarībā no laika,

— masas bilances demonstrācija,

— temperatūra un standartnovirze vai arī temperatūras diapazons testa laikā,

— koncentrāciju attiecības regresija attiecībā pret laiku,

— log $P_{ow,Av}$ vidējā vērtība un tās standartkļūda,

— rezultātu iztirzājums un interpretācija,

▼M4

— neapstrādātu reprezentatīvas analīzes skaitlisko datu piemēri (visi neapstrādātie izejdati jāuzglabā saskaņā ar labas laboratoriju prakses standartiem), arī attiecībā uz surogātstandartu atgūstamību, kalibrēšanas punktu skaits (kopā ar kalibrēšanas līknes korelācijas koeficienta kritērijiem) un kvalitātes nodrošināšanas / kvalitātes kontroles rezultāti,

— ja pieejams: noteikšanas procedūras validēšanas ziņojums (jānorāda ar atsauci).

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma A.8. nodaļa "Sadalījuma koeficients".

(3) Šā pielikuma A.8. nodaļa "Sadalījuma koeficients".

(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) Šā pielikuma A.6. nodaļa "Šķīdība ūdenī".

(11) Šā pielikuma C.7. nodaļa "Noārdīšanās – abiotiska noārdīšanās hidrolīze atkarībā no pH".

(12) Šā pielikuma C.4. nodaļa – II–VII daļa (A–F metode) "Vieglas bionoārdīšanās spējas noteikšana".

(13) Šā pielikuma A.4. nodaļa "Tvaika spiediens".

(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. papildinājums

Rēķintabula minimālo ūdens daudzumu aprēķināšanai, kuri vajadzīgi, lai ūdens fāzē noteiktu testējamās vielas ar dažādām log p_{ow} vērtībām

Pieņēmumi:

— atsevišķu alikvotu maksimālais daudzums = 10 % no kopējā daudzuma; 5 alikvotas = 50 % no kopējā daudzuma,

— testejamo vielu koncentracija = 0,7 × škidiba jebkura faze; zemāku koncentrāciju gadījumā būtu vajadzīgi lielāki daudzumi,

— *LOD* noteikšanā izmantotais daudzums = 100 ml,

— log P_{ow} attiecībā pret log S_w un log P_{ow} attiecībā pret SR (S_{oct}/S_w) pamatoti parāda ar testējamām vielām saistītās sakarības.

S_w noteikšana

log P_{ow}	Vienādojums	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–3,192	6,427E-04

S_{oct} noteikšana

log P_{ow}	Vienādojums	$S_{okt.}$ (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Testējamās vielas kopējā masa (mg)	$Masa_{okt.}/masa_{ūdens}$	$Masa_{H2O}$ (mg)	$Konc._{H2O}$ (mg/l)	$Masa_{okt.}$ (mg)	$Konc._{okt.}$ (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

Vērtību aprēķināšana

Minimālais daudzums, kas vajadzīgs H_2O fāzē katrā *LOD* koncentrācijā

log K_{ow}	LOD (mikrogrami/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
Daudzums, ko izmanto *LOD* (l)	0,1					

Aprēķinu atslēga

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 1 litra līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 2 litru līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 5 litru līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 10 litru līdzsvarošanas trauks.

Pārsniedz 10 % pat no 10 litru līdzsvarošanas trauka.

▼**M4**

Vajadzīgo daudzumu pārskats atkarībā no šķīdības ūdenī un Log P_{ow}

Minimālais daudzums, kas vajadzīgs H_2O fāzē katrā *LOD* koncentrācijā (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	*LOD (mikrogrami/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

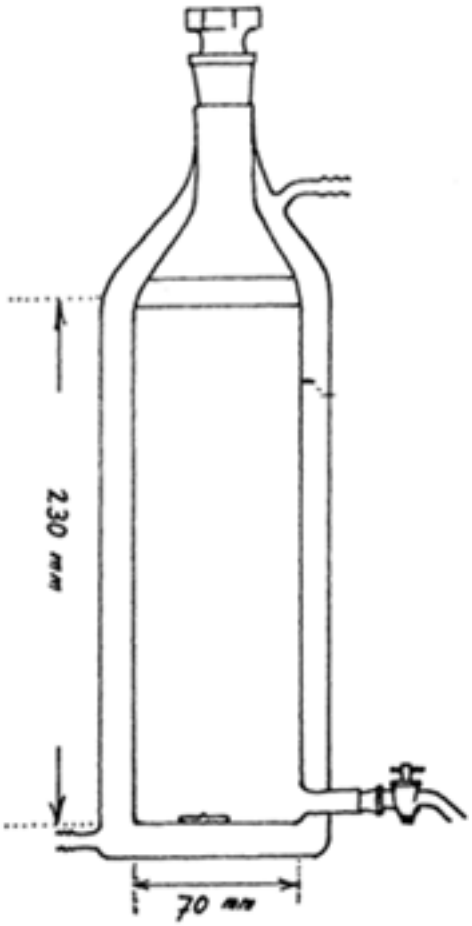
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	*LOD (mikrogrami/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
Daudzums, ko izmanto *LOD* (I)		0,1					

▼M4

2. papildinājums

Stikla apvalkā ietverts testēšanas trauks, ko izmanto P_{ow} eksperimentālai noteikšanai pēc lēnās maisīšanas metodes



▼M6

A.24. SADALĪJUMA KOEFICIENTS (N-OKTANOLS/ŪDENS), AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS ŠĶIDRUMHROMATOGRĀFIJAS *(HPLC)* METODE

IEVADS

Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 117 (2004. gads).

1. Sadalījuma koeficientu (P) definē kā izšķīdušās vielas līdzsvara koncentrāciju attiecību divfāzu sistēmā, ko veido divi šķīdinātāji ar savstarpēji ierobežotu šķīdību. Ja tas ir n-oktanols un ūdens:

$$P_{ow} = \frac{C_n - oktanols}{C_{ūdens}}$$

Tā kā sadalījuma koeficients ir divu koncentrāciju attiecība, tas ir bezdimensiju lielums un parasti ir izteikts decimāllogaritma veidā.

2. P_{ow} ir galvenais rādītājs pētījumos par ķīmisku vielu apriti vidē un mijiedarbību ar to. Ir pierādīta ļoti nozīmīga sakarība starp vielu nejonizēto formu P_{ow} un to bioakumulāciju zivīs. Ir arī pierādīts, ka P_{ow} palīdz prognozēt adsorbciju augsnē un sedimentos un izveidot struktūras un aktivitātes kvantitatīvās sakarības modeli plašam bioloģiskās ietekmes spektram.

3. Šīs testēšanas metodes sākotnējā priekšlikuma pamatā bija *C. V. Eadsforth* un *P. Moser* raksts (1). Metodes izstrādi un ESAO starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu 1986. gadā koordinēja Vācijas Federatīvās Republikas Federālā Vides aizsardzības aģentūra *(Umweltbundesamt)* (2).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

4. log P_{ow} vērtības diapazonā no – 2 līdz 4 (dažkārt līdz 5 un vairāk) [1] eksperimentāli var noteikt, izmantojot "kolbu kratīšanas" metodi (šā pielikuma A.8. nodaļa, ESAO Testēšanas norādījumi 107). *HPLC* metodi var lietot, ja log P_{ow} vērtības ir diapazonā no 0 līdz 6 (1)(2)(3)(4)(5). Lai izvēlētos piemērotas standartvielas un pamatotu visus secinājumus, kas iegūti no testēšanas rezultātiem, šai metodei var būt nepieciešams noteikt aptuvenu P_{ow} vērtību. Aprēķina metodes ir īsi izklāstītas šīs testēšanas metodes papildinājumā. *HPLC* darbības režīms ir izokrātisks.

5. P_{ow} vērtības ir atkarīgas no vides apstākļiem, piemēram, temperatūras, pH, šķīduma jonu spēka u. c., kas eksperimentā ir jānorāda pareizai P_{ow} datu interpretēšanai. Jonizējamām vielām var izmantot citu, alternatīvu metodi (piemēram, ESAO norādījumu projektu par pH-metriskajām metodēm jonizētām vielām (6)), kas var kļūt pieejama. Kaut arī šis ESAO norādījumu projekts var būt piemērots P_{ow} noteikšanai jonizējamām vielām, dažos gadījumos tomēr var būt atbilstošāk izmantot *HPLC* metodi, testēšanu veicot pie vides apstākļiem atbilstoša pH (sk. 9. punktu).

[1] Augšējās robežas vērtību nosaka nepieciešamība panākt fāzu pilnīgu atdalīšanos pēc sadalījuma līdzsvara korekcijas un pirms testēšanas paraugu ņemšanas analīzei. Ja testēšanu veic pietiekami rūpīgi, metodes darbības augšējo robežu attiecībā uz P_{ow} vērtībām var paaugstināt.

▼M6

METODES PRINCIPS

6. Apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfijai izmanto analītiskās kolonnas ar komerciāli pieejamu cietās fāzes pildījumu, ko veido garas ogļūdeņražu ķēdes (piemēram, C8, C18), kas ķīmiski saistītas ar silīcija dioksīdu.

7. Šādā kolonnā ievadītā viela sadalās starp kustīgo šķīdinātāja fāzi un ogļūdeņražu stacionāro fāzi, kad cauri kolonnai to nes kustīgā fāze. Vielas tiek aizturētas proporcionāli to sadalījuma koeficientam ogļūdeņražos/ūdenī; hidrofilas vielas eluējas pirmās, bet lipofilas vielas – pēdējās. Aiztures ilgums ir atkarīgs no aiztures koeficienta k, ko aprēķina saskaņā ar vienādojumu:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kur t_R ir nosakāmās vielas aiztures ilgums, t_0 ir tukšais laiks, t. i., vidējais laiks, kurā šķīdinātāja molekula izkļūst cauri kolonnai. Kvantitatīva analīze nav nepieciešama; jānosaka tikai aiztures ilgumi.

8. Testējamās vielas sadalījuma koeficientu sistēmā oktanols/ūdens var aprēķināt, eksperimentāli nosakot tās aiztures koeficientu k un ievadot k vienādojumā

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

kur

a, b = lineārās regresijas koeficienti.

Iepriekš norādīto vienādojumu var iegūt, veicot standartvielu oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu logaritma lineāro regresiju pret standartvielu aiztures koeficienta logaritmu.

9. Izmantojot apgrieztās fāzes *HPLC* metodi, var aprēķināt sadalījuma koeficientu log P_{ow} diapazonā no 0 līdz 6, bet izņēmuma gadījumos to var paplašināt, lai tajā būtu iekļauts arī log P_{ow} diapazonā no 6 līdz 10. Šādā gadījumā var būt nepieciešams pārveidot kustīgo fāzi (3). Šī metode nav izmantojama stiprām skābēm un bāzēm, metālu kompleksajiem savienojumiem, vielām, kas reaģē ar eluentu, un virsmaktīvajām vielām. Mērījumus jonizējamām vielām to nejonizētajā formā (brīva skābe vai brīva bāze) var veikt, tikai izmantojot piemērotu buferšķīdumu ar pH, kas brīvai skābei ir zemāks par pK_a, bet brīvai bāzei – augstāks par pK_a. Jonizējamu vielu (6) testēšanai var izmantot alternatīvu – pH-metrisko metodi (6), ja tāda ir pieejama. Ja ir noteikta log P_{ow} vērtība, lai vielu klasificētu pēc bīstamības videi vai novērtētu vides risku, testēšana veicama tādā pH diapazonā, kas atbilst dabiskajai videi, t. i., pH diapazonā no 5,0 līdz 9.

10. Dažos gadījumos piemaisījumi var apgrūtināt rezultātu interpretāciju smaiļu sadalījuma nenoteiktības dēļ. Maisījumiem, kuriem kādā no diapazoniem smailes nav atšķiramas, pārskatā jāiekļauj informācija par log P_{ow} augšējo un apakšējo robežu, kā arī katras log P_{ow} smailes laukumu (%). Maisījumiem, ko veido homologu grupas, ir jānorāda arī vidējais svērtais log P_{ow} (7), kas aprēķināts, izmantojot atsevišķās P_{ow} vērtības un atbilstošās laukuma % vērtības (8). Aprēķinos jāņem vērā visas smailes, kuru laukums ir vismaz 5 % smaiļu kopējā laukuma (9):

▼**M6**

$$vidējais\ svērtais \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(lauk.\ \%)}{kopējais\ smaiļu\ lauk.\ \%} = \frac{\sum (log\ P_{owi})(lauk.\ \%_i)}{\sum_i lauk.\ \%}$$

Vidējais svērtais log P_{ow} attiecas tikai uz vielām vai maisījumiem (piemēram, taleļļām), ko veido homologi (piemēram, alkānu rindas). Maisījumus var izmērīt, iegūstot nozīmīgus rezultātus, ar nosacījumu, ka izmantotajam analītiskajam detektoram ir vienāda jutība pret visām maisījuma vielām un ka tās iespējams pietiekami izšķirt.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

11. Pirms testēšanas sākšanas ir jāzina vielas disociācijas konstante, struktūrformula un šķīdība kustīgajā fāzē. Turklāt būtu lietderīga informācija par hidrolīzi.

KVALITĀTES KRITĒRIJI

12. Lai paaugstinātu mērījumu rezultātu ticamību, noteikšana jāveic divkārši.

— Atkārtojamība: log P_{ow} vērtībai, kas iegūta, veicot atkārtotus mērījumus vienādos apstākļos un izmantojot tādus pašus standartvielu kopumus, ir jābūt ± 0,1 log vienības diapazonā.

— Reproducējamība: ja mērījumi tiek atkārtoti, izmantojot atšķirīgus standartvielu kopumus, rezultāti var atšķirties. Parasti korelācijas koeficients R attiecībai starp log k un log P_{ow} standartvielu kopumam ir apmēram 0,9, kas atbilst log P_{ow} oktanola/ūdens sadalījuma koeficientam, kas ir ± 0,5 log vienības.

13. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā pierādīts, ka ar *HPLC* un "kolbu kratīšanas" metodēm var iegūt rezultātus ± 0,5 vienību diapazonā (2). Literatūrā ir izklāstīti arī citi salīdzinošās testēšanas rezultāti (4)(5)(10)(11)(12). Korelāciju grafiki, kas veidoti standartvielām ar līdzīgu struktūru, nodrošina vispareizākos rezultātus (13).

STANDARTVIELAS

14. Lai noteiktu korelāciju starp vielai izmērīto aiztures koeficientu k un tās P_{ow} vērtību, jāizveido kalibrēšanas grafiks, izmantojot mērījumus vismaz sešos punktos (sk. 24. punktu). Par piemērotu standartvielu izvēli ir atbildīgs metodes lietotājs. Parasti izvēlas standartvielas, kuru P_{ow} vērtību diapazons iekļauj testējamās vielas log P_{ow}, t. i., vismaz vienas standartvielas P_{ow} būtu jābūt lielākam par testējamās vielas P_{ow}, bet otras standartvielas P_{ow} – mazākam par testējamās vielas P_{ow}. Ekstrapolācija būtu veicama tikai izņēmuma gadījumos. Vēlams, lai šīs standartvielas būtu struktūras ziņā saistītas ar testējamo vielu. Kalibrēšanā izmantoto standartvielu log P_{ow} vērtībām jābūt iegūtām, pamatojoties uz uzticamiem eksperimentu datiem. Tomēr, ja par vielām ar augstu log P_{ow} (parasti vairāk nekā 4) nav pieejami uzticami eksperimentu dati, var izmantot aprēķinātās vērtības. Ja lieto ekstrapolētas vērtības, ir jānosaka to robežvērtība.

15. Daudzām ķīmisko vielu grupām ir publicēti plaši log P_{ow} vērtību saraksti (14)(15). Ja nav datu par līdzīgas struktūras vielu sadalījuma koeficientu vērtībām, var izmantot vispārīgāku kalibrēšanu, lietojot citas standartvielas. Ieteicamās standartvielas un to P_{ow} vērtības ir norādītas 1. tabulā. Jonizējamām vielām dotās vērtības attiecas uz to nejonizēto formu. Vērtību ticamība un kvalitāte ir pārbaudīta starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā.

▼**M6**

1. tabula.

Ieteicamās standartvielas

	CAS Nr.	Standartviela	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanons (metiletilketons)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridīns	0,5	
3	62-53-3	Anilīns	0,9	
4	103-84-4	Acetanilīds	1,0	
5	100-51-6	Benzilspirts	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenols;	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksietiķskābe	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenols	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenols	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitrils	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetonitrils	1,6	
12	589-18-4	4-metilbenzilspirts	1,6	
13	98-86-2	Acetofenons	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenols	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobenzoskābe	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-hloranilīns	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzols	1,9	
18	104-54-1	Cinamilspirts (kanēļspirts)	1,9	
19	65-85-0	Benzoskābe	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-krezols	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kanēļskābe	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anizols	2,1	
23	93-58-3	Metilbenzoāts	2,1	
24	71-43-2	Benzols	2,1	
25	99-04-7	3-metilbenzoskābe	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-hlorfenols	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trihloretilēns	2,4	
28	1912-24-9	Atrazīns	2,6	
29	93-89-0	Etilbenzoāts	2,6	

▼**M6**

	CAS Nr.	Standartviela	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-dihlorbenzonitrils	2,6	
31	535-80-8	3-hlorbenzoskābe	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluols	2,7	
33	90-15-3	1-naftols	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dihloranilīns	2,8	
35	108-90-7	Hlorbenzols	2,8	
36	1746-13-0	Alilfenilēteris	2,9	
37	108-86-1	Brombenzols	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzols	3,2	
39	119-61-9	Benzofenons	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenols	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timols	3,3	
42	106-46-7	1,4-dihlorbenzols	3,4	
43	122-39-4	Difenilamīns	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalīns	3,6	
45	93-99-2	Fenilbenzoāts	3,6	
46	98-82-8	Izopropilbenzols	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trihlorfenols	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenils	4,0	
49	120-51-4	Benzilbenzoāts	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butilfenols	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-trihlorbenzols	4,2	
52	143-07-7	Dodekānskābe	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenilēteris	4,2	
54	85-01-8	Fenantrēns	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzols	4,6	
56	103-29-7	Dibenzils	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridīns	4,9	
58	206-44-0	Fluorantēns	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamīns	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

METODES APRAKSTS

Sadalījuma koeficienta orientējoši aprēķini

16. Ja nepieciešams, testējamās vielas sadalījuma koeficientu var noteikt ar aprēķinu metodi (sk. papildinājumu) vai – attiecīgos gadījumos – izmantojot testējamās vielas šķīdības attiecību tīros šķīdinātājos.

Aprīkojums

17. Šķidruma fāzes hromatogrāfs, kas aprīkots ar vājas pulsācijas sūkni un piemērotu detektēšanas sistēmu. UV detektors, kura viļņu garums ir 210 nm, vai RI detektors ir piemērots plašam ķīmisku vielu grupu klāstam. Polāru grupu klātbūtne stacionārajā fāzē var būtiski pasliktināt kolonnas darbības efektivitāti. Tāpēc stacionārajā fāzē jābūt iespējami mazam polāro grupu saturam (16). Var izmantot tirdzniecībā pieejamas gatavas kolonnas ar pildījumu vai mikrodaļiņu apgrieztās fāzes pildījumu. Starp injicēšanas sistēmu un analītisko kolonnu var uzstādīt aizsargkolonnu.

Kustīgā fāze

18. Eluentu pirms lietošanas degazē, un tā pagatavošanai izmanto *HPLC* tīrības pakāpes metanolu un destilētu vai dejonizētu ūdeni. Jāizmanto izokrātiskā eluēšana. Jālieto metanola/ūdens maisījumi ar ūdens saturu vismaz 25 %. Parasti ar metanola-ūdens maisījumu 3:1 (tilpumu attiecība *(v/v))* stundas laikā ar plūsmas ātrumu 1 ml/min eluējas vielas, kuru log P ir 6. Vielām, kuru log P vērtība pārsniedz 6 (un arī standartvielām) eluēšanas laiks var būt jāsamazina, samazinot kustīgās fāzes polaritāti vai kolonnas garumu.

19. Testējamajai vielai un standartvielām jābūt šķīstošām kustīgajā fāzē pietiekamā koncentrācijā, lai tās varētu detektēt. Piedevas metanola/ūdens maisījumam izmanto tikai izņēmuma gadījumos, jo piedevu ietekmē mainās kolonnas īpašības. Šādos gadījumos ir jāpārliecinās, ka tas neietekmē testējamās vielas un standartvielu aiztures ilgumu. Ja metanola/ūdens maisījumu izmantot nevar, var lietot citus organisko šķīdinātāju un ūdens maisījumus, piemēram, etanola/ūdens, acetonitrila/ūdens vai izopropilspirta (2-propanola)/ūdens maisījumu.

20. Jonizējamām vielām ļoti svarīgs ir eluenta pH. Tam jābūt kolonnas pH darbības diapazonā, kas parasti ir no 2 līdz 8. Ieteicams izmantot buferšķīdumus. Jānovērš sāļu nogulsnēšanās un kolonnas bojāšanās, ko izraisa daži organiskās fāzes/buferšķīdumu maisījumi. Parasti nav ieteicams augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfijā izmantot stacionārās fāzes uz silīcija dioksīda bāzes ar pH virs 8, jo bāziska kustīgā fāze var izraisīt strauju kolonnas efektivitātes pasliktināšanos.

Šķīdināmās vielas

21. Testējamajām vielām un standartvielām jābūt pietiekami tīrām, lai hromatogrammās attiecīgajām vielām varētu skaidri noteikt smailes. Testēšanai vai kalibrēšanai izmantojamās vielas, ja iespējams, jāšķīdina kustīgajā fāzē. Ja testējamo vielu un standartvielu šķīdināšanai izmanto šķīdinātāju, kas nav kustīgā fāze, paraugu tieši pirms iešļircināšanas kolonnā atšķaida ar kustīgo fāzi.

Testēšanas apstākļi

22. Mērījumu laikā temperatūra nedrīkst mainīties par vairāk nekā ± 1 °C.

▼M6

Tukšā laika t_0 noteikšana

23. Tukšo laiku t_0 var izmērīt, izmantojot organiskas vielas, kas netiek aizturētas (piemēram, tiourīnvielu vai formamīdu). Precīzāk tukšo laiku var noteikt, izmērot aptuveni septiņu homoloģiskas rindas locekļu (piem., n-alkilmetilketonu) aiztures ilgumus (17). Aiztures ilgumus t_R (n_C + 1) grafikā atliek pret t_R (n_C), kur n_C ir oglekļa atomu skaits. Iegūst vienādojumam t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0 atbilstošu taisni, kur A jeb $k(n_C + 1)/k(n_C)$ ir konstante. Tukšo laiku t_0 aprēķina pēc krustpunkta parametra (1 – A)t_0 un virziena koeficienta A.

Regresijas vienādojums

24. Nākamais posms ir grafiski attēlot korelāciju starp attiecīgo standartvielu log P un log k, log P vērtībām esot tuvu paredzamajai testējamās vielas vērtībai. Praksē vienlaicīgi injicē no sešām līdz desmit standartvielām. Nosaka aiztures ilgumus; tam vēlams izmantot reģistrējošu integratoru, kas savienots ar detektēšanas sistēmu. Aiztures koeficientu attiecīgos logaritmus log k grafiski attēlo kā log P funkciju. Regresijas vienādojumu aprēķināšanu veic regulāri – vismaz reizi dienā, lai varētu ņemt vērā kolonnas efektivitātes iespējamās izmaiņas.

TESTĒJAMĀS VIELAS P_{OW} NOTEIKŠANA

25. Testējamo vielu injicē vismazākajos detektējamos daudzumos. Aiztures ilgumu nosaka divos replikātos. Testējamās vielas sadalījuma koeficientu nosaka, kalibrēšanas grafikā interpolējot aprēķināto aiztures koeficientu. Ļoti zemas un ļoti augstas sadalījuma koeficienta vērtības ir jānosaka ekstrapolējot. Šādos gadījumos īpaša vērība jāveltī regresijas līnijas ticamības robežām. Ja parauga aiztures ilgums nav standartvielām noteikto aiztures ilgumu robežās, būtu jānosaka robežvērtība.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Testēšanas pārskats

26. Testēšanas pārskatā iekļaujama šāda informācija:

— ja noteikts – sadalījuma koeficienta provizoriskā (aplēstā) vērtība, aplēstās vērtības un izmantotā metode; un – ja izmantota aprēķina metode – tās pilns apraksts, tostarp datubāzes identifikācija un detalizēta informācija par struktūrelementu izraudzīšanos;

— testējamās vielas un standartvielas tīrība, struktūrformula un *CAS* numurs,

— iekārtas un darba apstākļu apraksts: analītiskā kolonna, aizsargkolonna,

— kustīgā fāze, detektēšanas veids, temperatūras diapazons, pH;

— eluēšanās profili (hromatogrammas);

— tukšais laiks un tā noteikšanas paņēmiens;

— kalibrēšanai izmantoto standartvielu aiztures dati un literatūrā norādītās log P_{ow} vērtības;

— pielāgotās regresijas līnijas dati (log k pret log P_{ow}) un līnijas korelācijas koeficients, tostarp ticamības intervāli;

▼**M6**

— testējamās vielas vidējais aiztures laiks un interpolētā log P_{ow} vērtība,

— maisījumiem: eluēšanās profila hromatogramma ar noteiktajām robežvērtībām aprēķinos neiekļaujamo smaiļu laukumam;

— log P_{ow} vērtības attiecībā pret log P_{ow} smailes laukuma procentuālo vērtību;

— aprēķini, kas veikti, izmantojot regresijas līniju;

— vidējās svērtās log P_{ow} vērtības, ja tās ir aprēķinātas.

LITERATŪRA

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (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) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (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. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (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) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

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

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

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼**M6**

Papildinājums

P_{OW} aprēķina metodes

IEVADS

1. Šajā papildinājumā sniegts īss ieskats P_{ow} aprēķināšanā. Papildu informāciju sk. mācību grāmatās (1)(2).

2. Aprēķinātās P_{ow} vērtības izmanto turpmāk minētajiem nolūkiem:

— lai izlemtu, kuru eksperimentālo metodi izmantot: "kolbu kratīšanas" metodi, ja log P_{ow} vērtība ir no – 2 līdz 4, vai *HPLC* metodi, ja log P_{ow} vērtība ir no 0 līdz 6;

— lai izraudzītos *HPLC* metodes lietošanas apstākļus (standartvielas, metanola/ūdens attiecību);

— lai pārbaudītu ar eksperimentālajām metodēm iegūto vērtību ticamību;

— lai veiktu aplēses, ja nav iespējams izmantot eksperimentālās metodes.

Aprēķina metožu principi

3. Šajā dokumentā norādīto aprēķina metožu pamatā ir molekulu teorētiska sadalīšana atbilstošos struktūrelementos ar zināmu log P_{ow} izmaiņu soli. Vielas kopējo log P_{ow} aprēķina, summējot atsevišķo struktūrelementu vērtības un veicot korekciju – ņemot vērā iekšmolekulāro mijiedarbību. Struktūrelementu konstantes un korekcijas koeficienti ir atrodami (1)(2)(3)(4)(5)(6). Daļu no tiem regulāri atjaunina (3).

Aprēķināto vērtību ticamība

4. Parasti aprēķinu metodes ticamība pazeminās, paaugstinoties testējamās vielas struktūras sarežģītībai. Vienkāršām molekulām ar nelielu molekulmasu un vienu vai divām funkcionālajām grupām ar dažādām sadalīšanas metodēm noteiktās log P_{ow} vērtības var atšķirties no eksperimentāli noteiktajām par 0,1 līdz 0,3 vienībām. Kļūdas robežas lielums ir atkarīgs no struktūrelementu konstanšu ticamības, kā arī iespējas identificēt iekšmolekulāro mijiedarbību (piemēram, ūdeņraža saites) un korekcijas koeficientu pareizas lietošanas. Jonizējamām vielām ir jāņem vērā to lādiņš un jonizācijas pakāpe (10).

Fudžitas-Henša *(Fujita-Hansch)* π-metode

5. Hidrofobā aizvietotāja konstanti π, ko sākotnēji ieviesa Fudžita *et al.* (7), definē šādi:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}(PhX) - \log P_{ow}(PhH)$$

kur PhX ir aromātiskais atvasinājums, bet PhH – sākotnējā viela.

$$\text{piemēram, } ^{\pi}Cl = \log P_{ow}(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$$

π-metode galvenokārt ir lietojama aromātiskajiem savienojumiem. π-vērtības ir pieejamas lielam skaitam aizvietotāju (4)(5).

Rekera *(Rekker)* metode

6. Izmantojot Rekera metodi (8), log P_{ow} vērtību aprēķina saskaņā ar šādu vienādojumu:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{mijiedarbību raksturojošie locekļi})$$

▼M6

kur a_i ir attiecīgo struktūrelementu skaits molekulā, bet f_i – struktūrelementa log P_{ow} palielinājums. Mijiedarbību raksturojošos vienādojuma locekļus var izteikt vienas konstantes C_m (tā dēvētās "maģiskās konstantes") integrāļa daudzkārtņa veidā. Struktūrelementu konstantes f_i un C_m noteiktas ar daudzfaktoru regresijas analīzi, izmantojot 1 054 eksperimentāli iegūtas P_{ow} vērtības 825 vielām (6)(8). Mijiedarbību raksturojošos locekļus nosaka atbilstoši literatūrā (6)(8)(9) aprakstītajiem noteikumiem.

Henša–Leo *(Hansch-Leo)* metode

7. Izmantojot Henša–Leo metodi (4), log P_{ow} vērtību aprēķina saskaņā ar šādu vienādojumu:

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

kur f_i ir struktūrelementa konstante, F_j – korekcijas koeficients, a_i un b_j – attiecīgo struktūrelementu skaits molekulā. Ar mēģinājumu un kļūdu metodi, izmantojot eksperimentāli noteiktās P_{ow} vērtības, iegūts atomu un grupu struktūrelementu vērtību, kā arī korekcijas koeficientu F_j saraksts. Korekcijas koeficienti ir iedalīti vairākās klasēs (1)(4). Lai ņemtu vērā visus nosacījumus un korekcijas koeficientus, ir izstrādāta īpaša programmatūra (3).

KOMBINĒTĀ METODE

8. Sarežģītām molekulām log P_{ow} aprēķinus var ievērojami uzlabot, ja molekulu dala lielākos struktūrelementos, kuriem noteiktas ticamas log P_{ow} vērtības, kas iegūtas no tabulām (3)(4) vai eksperimentāli. Šādu struktūrelementu (heterociklu, antrahinona, azobenzola) novērtēšanā pēc tam var papildus izmantot Henša π vērtības vai ar Rekera vai Henša–Leo metodēm noteiktās struktūrelementu konstantes.

Piezīmes

i) Aprēķinu metodes daļēji vai pilnīgi jonizētiem savienojumiem var izmantot tikai tad, ja ir ņemti vērā nepieciešamie korekcijas koeficienti.

ii) Ja var pieņemt, ka savienojumā ir iekšmolekulāras ūdeņraža saites, jālieto attiecīgie korekcijas koeficienti (apmēram + 0,6 līdz + 1,0 log P_{ow} vienības) (1). Norādes par šādu saišu esību var iegūt, izmantojot molekulu struktūras telpiskos modeļus vai spektroskopijas datus.

iii) Ja savienojumam iespējamas vairākas tautomērās formas, aprēķinus izdara iespējamākajai no tām.

iv) Rūpīgi jāievēro izmaiņas struktūrelementu konstanšu tabulās.

LITERATŪRA PAR APRĒĶINA METODĒM

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

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

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

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

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

▼M7

A.25. **DISOCIĀCIJAS KONSTANTES ŪDENĪ (TITRĒŠANAS METODE — SPEKTROFOTOMETRISKĀ METODE — KONDUKTOMETRISKĀ METODE)**

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 112 (1981).

Priekšnosacījumi

— Piemērota analītiskā metode

— Šķīdība ūdenī

Norādījumi

— Struktūrformula

— Elektrovadītspēja konduktometriskajai metodei

Precizējumi

— Visas testēšanas metodes var veikt ar tīrām vai tirdzniecības kvalitātes vielām. Jāņem vērā piemaisījumu iespējamā ietekme uz rezultātiem.

— Titrēšanas metode nav piemērota vielām ar mazu šķīdību (sk. sadaļu "Testējamie šķīdumi").

— Spektrofotometriskā metode izmantojama vienīgi tām vielām, kuru disociētajām un nedisociētajām formām ir ievērojami atšķirīgs UV/VIS absorbcijas spektrs. Šī metode var būt piemērota arī vielām ar mazu šķīdību un neskābju/nebāzu disociācijām, piemēram, kompleksveidošanai.

— Gadījumos, kad ir izpildīts Onsagera vienādojums, drīkst izmantot konduktometrisko metodi, pat ja koncentrācijas ir samērā zemas un pat neskābju/nebāzu ķīmiskā līdzsvara gadījumos.

Standarta dokumenti

Šī testēšanas metode ir balstīta uz sadaļas "Literatūras saraksts" atsaucēs norādītajām metodēm un dokumentu "Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA" (1978. gada 18. augusts).

METODE — IEVADS, TESTA MĒRĶIS, PIELIETOJUMS, NOZĪMĪGUMS, IZMANTOŠANA UN IEROBEŽOJUMI

Vielas disociācija ūdenī ir svarīga, novērtējot tās ietekmi uz vidi. Tā nosaka vielas formu, kas savukārt nosaka tās izturēšanos un pārnesi. Tā var ietekmēt ķimikālijas adsorbciju augsnēs un sedimentos un absorbēšanos bioloģiskās šūnās.

Definīcijas un mērvienības

Disociācija ir atgriezeniskā sadalīšanās divos vai vairākos ķīmiskajos savienojumos, kuri var būt jonizēti. Šo procesu parasti apzīmē ar šādu formulu:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

un koncentrācijas līdzsvara konstante, kas nosaka šo reakciju, ir šāda:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Piemēram, konkrētajā gadījumā R ir ūdeņradis (viela ir skābe) un konstante ir

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

vai

$$pK_\alpha = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Standartvielas

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto turpmāk norādītās standartvielas. Tās galvenokārt ir norādītas tādēļ, lai ik pa laikam būtu iespējams veikt metodes kalibrēšanu un salīdzināt rezultātus gadījumos, kad tiek izmantota cita metode.

	pK ([1])	Temperatūra (°C)
p-nitrofenols	7,15	25
Benzoskābe	4,12	20
p-hloranilīns	3,93	20

([1]) Nav vērtība par 20 °C nav pieejama, taču var pieņemt, ka mērījumu rezultātu mainība ir lielāka nekā paredzamā atkarība no temperatūras.

Būtu lietderīgi izmantot vielu ar vairākiem pK, kā norādīts turpmāk sadaļā "Metodes princips". Tāda viela varētu būt:

Citronskābe	pK_a (8)	Temperatūra (°C)
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testēšanas metodes princips

Pie vides apstākļiem atbilstoša temperatūras diapazona aprakstītais ķīmiskais process parasti ir tikai mazliet atkarīgs no temperatūras. Lai noteiktu disociācijas konstanti, nepieciešams izmērīt ķīmiskās vielas disociēto un nedisociēto formu koncentrācijas. Pateicoties zināšanām, kas iegūtas par iepriekš sadaļā "Definīcijas un mērvienības" norādīto disociācijas reakcijas stehiometriju, ir iespējams noteikt attiecīgo konstanti. Šajā testēšanas metodē aprakstītajā konkrētajā gadījumā viela izturas kā skābe vai bāze, un noteikšana ir ērtāk veicama, nosakot vielas jonizēto un nejonizēto formu relatīvās koncentrācijas un šķīduma pH. Sakarība starp šiem lielumiem ir norādīta iepriekš sadaļā "Definīcijas un mērvienības" sniegtajā pK_a vienādojumā. Dažām vielām novērojama vairāk nekā viena disociācijas konstante, un ir iespējams izstrādāt līdzīgus vienādojumus. Dažas no šeit aprakstītajām metodēm ir piemērotas neskābju/nebāzu disociācijām.

Kvalitātes kritēriji

Atkārtojamība

Disociācijas konstante jāreplicē (ar vismaz trim mērījumiem) ± 0,1 log vienību robežās.

TESTA PROCEDŪRU APRAKSTS

Ir divas pamatpieejas pK_a noteikšanai. Pirmā pieeja ietver zināma daudzuma vielas titrēšanu ar standarta skābi vai attiecīgā gadījumā — ar bāzi; otra pieeja ietver jonizēto un nejonizēto formu relatīvās koncentrācijas un tās pH atkarības noteikšanu.

▼M7

Sagatavošanās

Uz minētajiem principiem balstītās metodes var klasificēt kā titrēšanas, spektrofotometriskās un konduktometriskās procedūras.

Testējamie šķīdumi

Titrēšanas metodes un konduktometriskās metodes gadījumā ķīmiskā viela jāizšķīdina destilētā ūdenī. Spektrofotometriskās metodes un citu metožu gadījumā izmanto buferšķīdumus. Testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,01 M vai pusi no piesātināta šķīduma koncentrācijas, un šķīdumu pagatavošanā jāizmanto iespējami tīrākā pieejamā viela. Ja viela ir tikai vāji šķīstoša, pirms tās pievienošanas iepriekš norādītajām koncentrācijām to var izšķīdināt nelielā daudzumā ar ūdeni pilnīgi sajaucama šķīdinātāja.

Ar Tindala staru jāpārbauda emulsiju klātbūtne šķīdumos, jo īpaši, ja šķīdības uzlabošanai ticis izmantots papildu šķīdinātājs. Ja tiek izmantoti buferšķīdumi, buferšķīduma koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,05 M.

Testēšanas apstākļi

Temperatūra

Temperatūra jāuztur vismaz ± 1 °C apmērā. Noteikšanu vēlams veikt 20 °C temperatūrā.

Ja ir aizdomas par būtisku atkarību no temperatūras, noteikšana jāveic vismaz divās citās temperatūrās. Tādā gadījumā temperatūras intervāliem jābūt 10 °C, bet uzturētajai temperatūrai — ± 0,1 °C.

Analīzes

Metodi nosaka, ņemot vērā testējamās vielas raksturīpašības. Tai jābūt pietiekami jutīgai, lai katrā testējamā šķīduma koncentrācijā būtu iespējams noteikt dažādās ķīmiskās sugas [*species*].

Testa veikšana

Titrēšanas metode

Testējamo šķīdumu nosaka, titrējot ar standarta bāzes vai attiecīgā gadījumā skābes šķīdumu, pēc katras titrēšanas šķīduma pievienošanas izmērot pH. Pirms ekvivalences punkta pakāpeniski jāpievieno vismaz 10 devas. Ja līdzsvars tiek sasniegts pietiekami ātri, var izmantot reģistrēšanas potenciometru. Lai izmantotu šo metodi, ir precīzi jāzina vielas kopīgais daudzums un tās koncentrācija. Jāveic piesardzības pasākumi, lai izslēgtu oglekļa dioksīda rašanos. Sīkāka informācija par procedūru, drošības pasākumiem un aprēķinu sniegta standarta testos, piemēram, (1), (2), (3) un (4).

Spektrofotometriskā metode

Viļņa garumu konstatē tad, ja jonizētajām un nejonizētajām vielas formām ir ievērojami atšķirīgi ekstinkcijas koeficienti. UV/VIS absorbcijas spektru iegūst no nemainīgas koncentrācijas šķīdumiem pH apstākļos, kur viela ir būtībā nejonizēta un pilnīgi jonizēta un tai ir vairākas pH starpvērtības. To iespējams paveikt, salīdzinoši lielam vielas šķīduma daudzumam daudzkomponentu buferī pakāpeniski pievienojot koncentrētas skābes (bāzes) devas, sākotnēji ar augstu (zemu) pH (atsauces līmenis: 5), vai nemainīgiem dažādu buferšķīdumu daudzumiem, kas aptver vēlamo pH diapazonu, pievienojot līdzvērtīgus vielas izejšķīduma daudzumus, piemēram, ūdenī, metanolā. No pH un absorbcijas vērtībām pie izvēlētā viļņa garuma aprēķina pietiekamu pK_a vērtību skaitu, izmantojot datus no vismaz 5 pH, ja vismaz 10 procenti un mazāk nekā 90 procenti vielas ir jonizēti. Sīkāka informācija par eksperimentu un aprēķināšanas metodi sniegta (1).

▼M7

Konduktometriskā metode

Izmantojot vadītspējas šūnu ar mazu, zināmu šūnas konstanti, mēra aptuveni 0,1 M vielas šķīduma vadītspējīgā ūdenī vadītspēju. Mēra arī vairāku precīzi sagatavotu šā šķīduma atšķaidījumu vadītspēju. Koncentrāciju ikreiz samazina uz pusi, un šai testu virknei jāaptver vismaz koncentrācijas lieluma kārta. Robežvadītspēju bezgalīgā atšķaidījumā konstatē, veicot līdzīgu eksperimentu ar Na sāli un ekstrapolējot. Tad, izmantojot Onsangera vienādojumu, pēc katra šķīduma vadītspējas iespējams aprēķināt disociācijas pakāpi un tādējādi, izmantojot Ostvalda atšķaidīšanas likumu, disociācijas konstanti var aprēķināt kā $K = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, kur C ir koncentrācija molos uz vienu litru, bet α — disociētā daļa. Jāveic piesardzības pasākumi, lai izslēgtu CO_2 rašanos. Sīkāka informācija par eksperimentu un aprēķināšanas metodi sniegta standarta tekstos un atsaucēs (1), (6) un (7).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Titrēšanas metode

Titrēšanas līknē 10 mērīšanas punktiem aprēķina pK_a. Aprēķina minēto pK_a vērtību vidējo un standartnovirzi. Jāiekļauj grafiks, kurā pH atlikts pret standartbāzes vai standartskābes tilpumu, un šīs informācijas attēlojums tabulā.

Spektrofotometriskās metodes

Tabulā norāda datus par katra spektra absorbciju un pH. No starpposma spektra datu punktiem aprēķina vismaz piecas pK_a vērtības, un aprēķina arī šo rezultātu vidējo un standartnovirzi.

Konduktometriskā metode

Katrai skābes koncentrācijai un katrai tāda maisījuma koncentrācijai, kas ir viena skābes ekvivalenta maisījums ar 0,98 karbonātu nesaturoša nātrija hidroksīda ekvivalentiem, aprēķina ekvivalenta vadītspēju Λ. Skābes daudzums ir pārmērīgi liels, lai novērstu hidrolīzes radītu pārmērīgi lielu OH^-. 1/Λ atliek pret Ö_C, un sāls Λ_o var noteikt, veicot ekstrapolāciju līdz nulles koncentrācijai.

Skābes Λ_o iespējams aprēķināt, izmantojot literatūras datus par H^+ un Na^+. Katrai koncentrācijai iespējams aprēķināt pKa, izmantojot $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ un $Ka = \alpha^2C/(1 - \alpha)$. Ka vērtības iespējams uzlabot, tās koriģējot pēc mobilitātes un aktivitātes. Jāaprēķina pK_a vērtību vidējais un standartnovirzes.

Testēšanas pārskats

Jāsniedz visi neapstrādātie dati un aprēķinātās pK_a vērtības, kā arī iepriekš aprakstītie statistiskie parametri kopā ar aprēķināšanas metodi (vēlams, tabulas veidā, kā norādīts atsaucē Nr. 1). Attiecībā uz titrēšanas metodēm jānorāda sīka informācija par titrēšanas šķīdumu standartizēšanu.

Attiecībā uz spektrofotometrisko metodi jāiesniedz visi spektri. Attiecībā uz konduktometrisko metodi jāsniedz sīka informācija par šūnas konstantes noteikšanu. Jāsniedz informācija par izmantoto paņēmienu, analītiskajām metodēm un visu izmantoto buferšķīdumu raksturīpašībām.

Jānorāda testēšanas temperatūra(-s).

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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 (skatīt iepriekš).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

B DAĻA: TOKSICITĀTES UN CITU IETEKMJU UZ VESELĪBU NOTEIKŠANAS METODES

SATURS

VISPĀRĪGS IEVADS

B.1.a AKŪTAIS PERORĀLAIS TOKSISKUMS – FIKSĒTĀS DEVAS METODE

B.1.b AKŪTS PERORĀLS TOKSISKUMS – AKŪTA TOKSISKUMA KLASES METODE

B.2. AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE

B.3. AKŪTA TOKSICITĀTE (ĀDAS)

B.4. AKŪTS ĀDAS KAIRINĀJUMS/KOROZIJA (KODĪGA IEDARBĪBA UZ ĀDU)

B.5. AKŪTS ACU KAIRINĀJUMS/KOROZIJA

B.6. ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA

B.7. ATKĀRTOTAS DEVAS 28 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR GRAUZĒJIEM

B.8. SUBAKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 28 DIENU PĒTĪJUMS

B.9. ATKĀRTOTĀS DEVAS (28 DIENU) TOKSICITĀTE (ĀDAS)

B.10. ZĪDĪTĀJU *IN VITRO* HROMOSOMĀLO ABERĀCIJU TESTS

B.11. ZĪDĪTĀJU KAULU SMADZEŅU HROMOSOMU ABERĀCIJAS TESTS

B.12. ZĪDĪTĀJU ERITROCĪTU MIKROKODOLU TESTS

B.13./14. MUTAGENITĀTE – BAKTĒRIJU REVERSĀS MUTĀCIJAS

B.17. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR GĒNIEM HPRT UN XPRT

B.21. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU TRANSFORMĀCIJA *IN VITRO*

B.22. GRAUZĒJU DOMINANTO LETĀLO MUTĀCIJU TESTS

▼B

B.23.	ZĪDĪTĀJU SPERMATOGONIJU HROMOSOMU ABERĀCIJU TESTS
B.25.	PĀRMANTOJAMO TRANSLOKĀCIJU NOTEIKŠANA PELĒM
B.26.	SUBHRONISKĀS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS – ATKĀRTOTO DEVU 90 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR GRAUZĒJIEM
B.27.	SUBHRONISKĀS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS – ATKĀRTOTO DEVU 90 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR DZĪVNIEKIEM, KAS NAV GRAUZĒJI
B.28.	SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC ĀRĪGAS APLIKĀCIJAS – ATKĀRTOTA ĀRĪGA APLIKĀCIJA GRAUZĒJIEM (90 DIENAS)
B.29.	SUBHRONISKĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 90 DIENU PĒTĪJUMS
B.30.	HRONISKĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI
B.31.	PRENATĀLĀS ONTOĢENĒZES TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS
B.32.	KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI
B.33.	APVIENOTIE HRONISKĀS TOKSICITĀTES UN KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI
B.34.	TOKSICITĀTES IETEKME UZ VIENAS PAAUDZES REPRODUKTĪVO FUNKCIJU
B.35.	DIVU PAAUDŽU REPRODUKTĪVĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS
B.36.	TOKSIKOKINĒTIKA
B.37.	FOSFORORGANISKO VIELU AIZKAVĒTĀ NEIROTOKSICITĀTE PĒC AKŪTAS IEDARBĪBAS
B.38.	FOSFORORGANISKO VIELU AIZKAVĒTĀS NEIROTOKSICITĀTES 28 DIENU VAIRĀKKĀRTĒJAS DEVAS PĒTĪJUMS
B.39.	NEPROGRAMMĒTAS DNS SINTĒZES (UDS) TESTS AR ZĪDĪTĀJU AKNU ŠŪNĀM *IN VIVO*
B.40.	ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: TRANSKUTĀNĀS ELEKTRISKĀS PRETESTĪBAS (TEP) TESTS
B.40.a	ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: REKONSTRUĒTAS CILVĒKA EPIDERMAS RhE TESTS
B.41.	FOTOTOKSICITĀTES *IN VITRO 3T3 NRU* TESTS
B.42.	ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (*LLNA*)

▼B

B.43. ŽURKU NEIROTOKSICITĀTES PĒTĪJUMS

B.44. ABSORBCIJA ĀDĀ: *IN VIVO* METODE

B.45. ABSORBCIJA ĀDĀ: *IN VITRO* METODE

B.46. ĀDAS KAIRINĀJUMA NOTEIKŠANA AR CILVĒKA EPIDERMAS REKONSTRUKCIJAS MODEĻA *IN VITRO* TESTU

B.47. LIELLOPU RADZENES APDUĻĶOŠANĀS UN CAURLAIDĪBAS TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ I) NOPIETNU ACU BOJĀJUMU INDUCĒTĀJAS ĶIMIKĀLIJAS UN II) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ PAR TĀDĀM, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

B.48. IZOLĒTAS VISTAS ACS TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ I) NOPIETNU ACU BOJĀJUMU INDUCĒTĀJAS ĶIMIKĀLIJAS UN II) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ PAR TĀDĀM, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

B.49. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU MIKROKODOLU *IN VITRO* TESTS

B.50. ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (LLNA:DA)

B.51. ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (LLNA:BrdU-ELISA)

B.52. AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: AKŪTĀS TOKSICITĀTES KLASES METODE

B.53. ONTOĢENĒZES NEIROTOKSICITĀTES PĒTĪJUMS

B.54. UTEROTROPAIS BIOTESTS AR GRAUZĒJIEM: ESTROGĒNO ĪPAŠĪBU ĪSĀ SKRĪNINGA TESTS

B.55. HERŠBERGERA BIOTESTS AR žURKĀM: (ANTI)ANDROGĒNO ĪPAŠĪBU ĪSĀ SKRĪNINGA TESTS

B.56. PAPLAŠINĀTAIS VIENAS PAAUDZES REPRODUKTĪVĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS

B.57. H295R STEROĪDĢENĒZES TESTS

B.58. TRANSGĒNU GRAUZĒJU SOMATISKO ŠŪNU UN DZIMUMŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU TESTI

B.59. *IN CHEMICO* ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: TIEŠAIS PEPTĪDREAĢĒTSPĒJAS TESTS (*DPRA*)

B.60. *IN VITRO* ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: *ARE-NRF2* LUCIFERĀZES TESTĒŠANAS METODE

B.61. FLUORESCEĪNA CAURPLŪDES TESTĒŠANAS METODE ACU KOROZIJAS VAI NOPIETNA KAIRINĀJUMA IZRAISĪTĀJU IDENTIFICĒŠANAI

B.62. ZĪDĪTĀJU "KOMĒTAS" *IN VIVO* TESTS SĀRMAINĀ VIDĒ

▼B

B.63. REPRODUKTĪVĀS / ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTS

B.64. KOMBINĒTS ATKĀRTOTAS DEVAS TOKSISKUMA PĒTĪJUMS AR REPRODUKTĪVĀS/ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTU

B.65. *IN VITRO* BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODE ATTIECĪBĀ UZ ĀDAS KOROZIJU

B.66. STABILI TRANSFICĒTAS TRANSAKTIVĀCIJAS *IN VITRO* TESTI, AR KO KONSTATĒ ESTROGĒNU RECEPTORU AGONISTUS UN ANTAGONISTUS

B.67. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR TIMIDĪNKINĀZES GĒNU

B.68. ĪSA EKSPOZĪCIJAS LAIKA IN VITRO TESTĒŠANAS METODE, AR KURU IDENTIFICĒT i) ĶIMIKĀLIJAS, KAS IZRAISA NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, UN ii) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ KĀ ACU KAIRINĀJUMA VAI NOPIETNU ACU BOJĀJUMU IZRAISĪTĀJAS

B.69. REKONSTRUĒTA, CILVĒKA RADZENEI LĪDZĪGA EPITĒLIJA (*RhCE*) TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

B.70. CILVĒKA REKOMBINANTIE ESTROGĒNRECEPTORU (*hr*ER) *IN VITRO* TESTI TĀDU ĶIMIKĀLIJU NOTEIKŠANAI, KAM PIEMĪT ER AFINITĀTE

B.71. ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJAS TESTI, KUROS APSKATĪTS ĀDAS SENSIBILIZĀCIJAS NELABVĒLĪGĀ IZNĀKUMA CEĻA (*AOP*) ATSLĒGNOTIKUMS "DENDRĪTISKO ŠŪNU AKTIVĀCIJA"

▼B

VISPĀRĪGS IEVADS

A. TESTA VIELAS RAKSTUROJUMS

Pirms toksicitātes pētījuma uzsākšanas ir jābūt zināmai testa vielas uzbūvei, iekļaujot galvenos piemaisījumus, un tās attiecīgajām fizikāli ķīmiskajām īpašībām, iekļaujot stabilitāti.

Testa vielas fizikāli ķīmiskās īpašības sniedz svarīgu informāciju, lai izvēlētos ievadīšanas veidu, katra konkrēta pētījuma plānu un veidu, kā rīkoties ar testa vielu un kā to glabāt.

Pirms pētījuma uzsākšanas jāizveido analītiskā metode testa vielas kvantitatīvai un kvalitatīvai noteikšanai (ja iespējams, iekļaujot galvenos piemaisījumus) dozēšanas vidē un bioloģiskajā materiālā.

Visa informācija, kas attiecas uz testa vielas identifikāciju, fizikāli ķīmiskajām īpašībām, tīrību un izturēšanos, ir jāiekļauj testa ziņojumā.

B. DZĪVNIEKU KOPŠANA

Toksicitātes testos būtiski svarīga ir stingra vides apstākļu kontrole un pareiza dzīvnieku kopšanas tehnika.

i) *Turēšanas apstākļi*

Vides apstākļiem eksperimenta dzīvnieku telpās vai iežogojumos ir jābūt testa dzīvniekiem piemērotiem. Žurkām, pelēm un jūrascūciņām piemēroti apstākļi ir telpas temperatūra 22 °C ± 3 °C ar relatīvo mitrumu 30 līdz 70 %; trušiem temperatūrai jābūt 20 °C ± 3 °C ar relatīvo mitrumu 30 līdz 70 %.

Dažas eksperimenta metodes ir īpaši jutīgas pret temperatūras ietekmi, un tādos gadījumos datus par attiecīgajiem apstākļiem iekļauj testa metodes aprakstā. Visos toksisko ietekmju pētījumos temperatūra un mitrums ir jākontrolē, jāreģistrē un jāiekļauj pētījuma galaziņojumā.

Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Sīkas ziņas par apgaismojuma apstākļiem ir jāreģistrē un jāiekļauj pētījuma galaziņojumā.

Ja metodē nav noteikts citādi, dzīvniekus var turēt atsevišķi vai turēt būros nelielās viena dzimuma grupās; turot grupās, vienā būri nedrīkst ievietot vairāk par pieciem dzīvniekiem.

Ziņojumos par eksperimentiem ar dzīvniekiem ir svarīgi norādīt izmantoto būros turēšanas veidu un katrā būrī ievietoto dzīvnieku skaitu gan ķīmiskās vielas iedarbības laikā, gan arī katrā turpmākajā novērošanas laikposmā.

▼B

ii) *Barošanas apstākļi*

Diētai ir jāatbilst visām testējamās sugas vajadzībām attiecībā uz barību. Ja testa vielas dzīvniekiem ievada ar diētu, uzturvērtība var samazināties vielas un diētas sastāvdaļas savstarpējā iedarbībā. Šādas reakcijas iespēja ir jāņem vērā, interpretējot testu rezultātus. Var izmantot parastās laboratorijas diētas ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Diētas izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testa vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šo metodi.

Diētas piesārņotāji, par kuriem ir zināms, ka tie ietekmē toksicitāti, nedrīkst būt klāt iedarbīgās koncentrācijās.

C. **ALTERNATĪVA TESTĒŠANA**

Eiropas Savienības zinātniskais mērķis ir izveidot un apstiprināt alternatīvas metodes, kas var sniegt to pašu informācijas līmeni kā pašreizējie testi ar dzīvniekiem, bet kas izmanto mazāk dzīvnieku, izraisa mazāk ciešanu vai pilnīgi izvairās izmantot dzīvniekus.

Tādas metodes, kad tās kļūst pieejamas, jāņem vērā, kur vien iespējams, lai raksturotu bīstamību un izdarītu piemītošās bīstamības klasifikāciju un marķēšanu.

D. **NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA**

Novērtējot un interpretējot testus, ir jāņem vērā ierobežojumi, kādā mērā pētījumus ar dzīvniekiem un *in vitro* pētījumus var tieši ekstrapolēt uz cilvēku, un tādēļ pierādījumus par kaitīgu ietekmi uz cilvēkiem, ja pierādījumi ir pieejami, var izmantot testēšanas rezultātu apstiprināšanai.

E. **LITERATŪRAS NORĀDES**

Vairums šo metožu ir izveidotas ESAO testēšanas pamatnostādņu programmas satvarā, un tās ir jāveic atbilstīgi Labas laboratorijas prakses principiem, lai iespējami plaši nodrošinātu “datu savstarpējo atzīšanu”.

Papildu informācija ir atrodama ESAO pamatnostādnēs un citur publicētā attiecīgā literatūrā.

▼B

B.1. a **AKŪTAIS PERORĀLAIS TOKSISKUMS – FIKSĒTĀS DEVAS METODE**

1. **METODE**

Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO 420 (2001) vadlīnijā noteiktajai metodei.

1.1. IEVADS

Akūtā toksiskuma novērtēšanas tradicionālajās metodēs par beigu punktu izmanto dzīvnieku nobeigšanos. Jaunu pieeju akūtā toksiskuma noteikšanai, kuras pamatā ir vairāku fiksētu devu ievadīšana, 1984. gadā ieteica Britu Toksikoloģijas biedrība (1). Saskaņā ar šo pieeju izvairās par beigu punktu izmantot dzīvnieku nobeigšanos, tās vietā novērojot vairāku fiksētu devu toksiskuma pazīmes. Pēc Apvienotajā Karalistē (2) un starptautiski (3) *in vivo* veiktajiem validācijas pētījumiem šī procedūra 1992. gadā tika pieņemta par testa metodi. Tādējādi, izmantojot matemātiskos modeļus, fiksēto devu procedūras statistiskie raksturlielumi vēlāk tika novērtēti vairākos pētījumos (4) (5) (6). Modelēšanas pētījumi un *in vivo* pētījumi uzskatāmi parādījuši, ka procedūra ir reproducējama, tai jāizmanto mazāk dzīvnieku, izraisa mazāk ciešanu nekā tradicionālās metodes un nodrošina iespējas novērtēt vielas līdzvērtīgā veidā kā ar citām akūtā toksiskuma testa metodēm.

Norādījumi par katrā konkrētā gadījumā piemērotāko testa metodi atrodami pamatnostādnēs par akūtā perorālā toksiskuma testēšanu *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (7). Šajās pamatnostādnēs ir arī papildu informācija par testa metodes B.1.a veikšanu un pēc tās iegūto rezultātu interpretāciju.

Saskaņā ar metodes principu galvenajos pētījumos izmanto tikai mēreni toksiskas devas un jāizvairās lietot tādas devas, kurām varētu būt letāla iedarbība. Tāpat nav jāievada devas, par kurām ir zināms, ka tās izraisa izteiktas sāpju un briesmu sajūtas kodīgo vai stipri kairinošo īpašību dēļ. Bojā ejoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipru un ilgstošu briesmu sajūtu, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testa rezultātus, tie jāņem vērā tieši tāpat kā testos nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt bojā ejošus dzīvniekus vai dzīvniekus, kuriem ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos norādīti citās pamatnostādnēs (8).

Metode sniedz informāciju par bīstamajām īpašībām un dod iespējas novērtēt un klasificēt vielas ar akūti toksisku iedarbību saskaņā ar Vispārējo saskaņoto ķīmisko vielu klasifikācijas sistēmu (VSS) (9).

Pirms uzsākt pētījumus, testēšanas laboratorijai jāņem vērā visa par testējamo vielu pieejamā informācija. Pie šādas informācijas pieder tās identifikācija un ķīmiskā struktūra, fizikāli ķīmiskās īpašības, citu *in vitro* vai *in vivo* veikto testu rezultāti, toksikoloģiskie dati par struktūras ziņā saistītām vielām, vielas paredzamo(-ajiem) izmantošanas veidu(-iem). Šī informācija ir vajadzīga, lai nodrošinātu, ka testi tiek veikti cilvēku veselības aizsardzībai piemērotā veidā un tiek pareizi izraudzīta sākotnējā deva.

▼B

1.2. DEFINĪCIJAS

Akūts perorāls toksiskums: attiecas uz to kaitīgo iedarbību, kāda ir 24 stundu laikā pēc vienas vai vairāku vielas devu ievadīšanas caur muti.

Aizkavēta nāve: ir tad, ja dzīvnieks 48 stundu laikā nav nobeidzies vai neizbēgami nav gājis bojā, bet krīt vēlāk 14 dienu novērošanas perioda laikā.

Deva: ievadītās testējamās vielas daudzums. Devu izsaka testējamās vielas svara veidā uz testa dzīvnieka svara vienību (piemēram, mg/kg).

Izteikts toksiskums: ir vispārīgs termins, ar ko raksturo acīm redzamas toksiskas iedarbības pazīmes pēc testējamo vielu ievadīšanas (piemēram, skatīt izmantotās literatūras sarakstā (3)), un nākamās lielākās devas iedarbībā var sagaidīt izmēģinājuma dzīvnieku lielākās daļas nobeigšanos, izraisot stipras sāpes vai smagas un ilgstošas ciešanas (kritēriji noteikti *Humane Endpoints Guidance Document* (8)).

VSS: Vispārējā saskaņotā ķīmisko vielu un maisījumu klasifikācijas sistēma. Kopīgs ESAO (cilvēku veselības un vides aizsardzība), ANO Bīstamo kravu pārvadājumu ekspertu komitejas (fizikāli ķīmiskās īpašības) un *ILO* – Starptautiskās Darba organizācijas (kaitīguma paziņošana) – pasākums, ko koordinē Ķīmisko vielu drošas apsaimniekošanas starporganizāciju programma (*IOMC*).

Neizbēgama nāve ir, ja miršana vai nāves iestāšanās sagaidāma pirms nākamā plānotā novērojumu laika. Pazīmes, kas liecina par šā stāvokļa iestāšanos grauzējiem var būt konvulsijas, gulēšana uz sāniem vai augšpēdus un drebēšana. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (8).)

LD_{50} (vidējā letālā deva): statistiski noteikta vielas deva, kas, ievadot perorāli, var izraisīt 50 % dzīvnieku nobeigšanos. LD_{50} vērtību izsaka kā testējamās vielas svaru uz testa dzīvnieka svara vienību (mg/kg).

Robeždeva attiecas uz devas augšējo ierobežojumu testā (2 000 vai 5 000 mg/kg).

Mirstošs: atrašanās stāvoklī, kad mirst vai nav iespēju izdzīvot, arī saņemot ārstēšanu. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (8).)

Prognozējama nāve: klīniskās pazīmes, kas liecina par nāves iestāšanos pēc zināma laika, nesagaidot eksperimenta plānotās beigas, piemēram – nespēja sasniegt ūdeni vai barību. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (8).)

▼B

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Viena dzimuma dzīvnieku grupām dod pakāpeniski palielinātas fiksētas devas 5, 50, 300 un 2 000 mg/kg (izņēmuma gadījumos var izmantot papildu fiksētu devu 5 000 mg/kg, skatīt 1.6.2. punktu). Sākotnējās devas līmeni izraugās pēc devu diapazona pētījumiem kā devu, kas var izraisīt toksiskas iedarbības pazīmes, bet kas nav stipri toksiska un neizraisa nobeigšanos. Klīniskās pazīmes un stāvokļi, kas saistīti ar sāpēm, ciešanām un neizbēgamu nāvi, sīki aprakstīti ESAO pamatnostādnēs (8). Atkarībā no toksiskuma pazīmēm vai mirstības papildu dzīvnieku grupām var ievadīt par to augstākas vai zemākas fiksētas devas. Šo procedūru turpina, līdz fiksētā deva izraisa izteiktas toksiskuma pazīmes, tiek konstatēts ne vairāk kā viens nobeigšanās gadījums, augstākajai devai netiek konstatētas toksiskas iedarbības pazīmes vai notiek nobeigšanās zemākās devas iedarbībā.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Ieteicamākā grauzēju suga ir žurkas, kaut arī var izmanot citas grauzēju sugas. Parasti izmanto sievišķā dzimuma īpatņus (7). Tas tāpēc, ka parasto LD_{50} testu literatūras pārskati liecina, ka abu dzimumu jutība daudz neatšķiras, taču gadījumos, kad tā ir atšķirīga, sievišķā dzimuma īpatņi ir nedaudz jutīgāki (10). Tomēr, ja dati par struktūras ziņā līdzvērtīgu vielu toksikoloģiskajām un toksikokinētiskajām īpašībām liecina, ka uz testējamās vielas iedarbību tēviņi varētu būt jutīgāki, testi jāveic ar vīrišķā dzimuma īpatņiem. Ja testus veic ar vīrišķā dzimuma īpatņiem, tas ir jāpamato.

Jāizmanto jauni, veseli, pieauguši parasti izmantojamo laboratorijas līniju dzīvnieki. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Visiem testa dzīvniekiem testēšanas sākumā jābūt 8 līdz 12 nedēļas veciem, un to svaram jābūt ± 20 % no testiem iepriekš izmantoto dzīvnieku vidējā svara.

1.4.2. **Turēšanas un barošanas nosacījumi**

Telpā, kurā tur izmēģinājumu dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Dzīvniekus būros var turēt grupās atbilstoši devai, bet to skaits vienā būrī nedrīkst apgrūtināt katra dzīvnieka novērošanu.

1.4.3. **Dzīvnieku sagatavošana**

Veselus, pieaugušus, jaunus dzīvniekus izvēlas izlases veidā, marķē individuālai identificēšanai un tur būros vismaz piecas dienas pirms devu ievadīšanas sākuma, lai aklimatizētu laboratorijas apstākļiem.

▼B

1.4.4. **Devu sagatavošana**

Parasti testējamās vielas jāievada visām pārbaudāmajām devām vienādā tilpumā, mainot ievadāmā preparāta koncentrāciju. Taču, ja jātestē galaprodukts, kas ir šķidrums vai maisījums, vielas bīstamības novērtēšanai tā var būt jāizmanto neatšķaidītā testējamās vielas veidā, t. i., ar nemainīgu koncentrāciju, un tā ir arī dažu reglamentējošo iestāžu prasība. Jebkurā gadījumā nedrīkst pārsniegt ievadāmās devas maksimālo tilpumu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Grauzējiem šis tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1ml/100 g ķermeņa svara; tomēr ūdens šķīdumu gadījumā var ievadīt līdz 2 ml/100 g ķermeņa svara. Ņemot vērā ievadāmā preparāta sastāvu, vienmēr, kad iespējams, ieteicams izmantot šķīdumu/suspensiju/emulsiju ūdenī, ja ne, tad šķīdumu/suspensiju/emulsiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā) un tikai pēc tam šķīdumu citos nesējos. Ja par nesēju neizmanto ūdeni, jānoskaidro tā toksikoloģiskās īpašības. Ja nav datu par preparāta pietiekamu stabilitāti visā tā lietošanas laikā, devas jāsagatavo neilgi pirms ievadīšanas.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Devu ievadīšana**

Testējamo vielu dzīvniekiem ievada vienā devā, mākslīgi barojot, izmantojot kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas kanulu. Ja kādu apstākļu dēļ ievadīt vienā devā nav iespējams, to var dot mazākās daļās laika posmā, kas nepārsniedz 24 stundas.

Pirms ievadīšanas dzīvniekus nedrīkst barot (piemēram, žurkas pārstāj barot iepriekšējā dienā, dodot tikai dzert ūdeni; peles nebaro 3–4 stundas iepriekš, dodot dzert tikai ūdeni). Pirms ievada testējamo vielu pēc nebarošanas perioda, dzīvnieki ir jānosver. Pēc testējamās vielas ievadīšanas žurkas var nebarot vēl 3–4 stundas, bet peles – 1–2 stundas. Ja devu ievada pa daļām ilgākā laika posmā, var būt nepieciešams dzīvniekiem dot barību un ūdeni atkarībā no šā laika posma ilguma.

1.5.2. **Devu diapazona pētījums**

Devu diapazona pētījuma mērķis ir noteikt galvenajā pētījumā izmantojamo sākotnējo devu. Testējamo vielu atsevišķiem dzīvniekiem ievada pēc 1. papildinājumā noteiktajām diagrammām. Devu diapazona pētījumu beidz, kad var pieņemt lēmumu par galvenajā pētījumā izmantojamo sākotnējo devu (vai kad pie mazākās fiksētās devas tiek konstatēta dzīvnieku nobeigšanās).

Devu diapazona pētījumam attiecībā uz sākotnējo devu izraugās no fiksēto līmeņu devām 5, 50, 300 un 2 000 mg/kg to devu, kurai paredzams izteikts toksiskums, par ko, iespējams, ir pierādījumi par tās pašas vielas vai struktūras ziņā līdzvērtīgu vielu *in vitro* un *in vivo* testu rezultātiem. Ja šādas informācijas nav, par sākotnējo devu izmanto 300 mg/kg.

Katram dzīvniekam vielas ievadīšanas starplaikam jābūt vismaz 24 stundām. Visi dzīvnieki jānovēro vismaz 14 dienas.

▼B

Augšējo devu 5 000 mg/kg var izmantot tikai izņēmuma gadījumos, kad tā ir pamatota ar īpašām reglamentējošām prasībām (skatīt 3. papildinājumu). Pamatojoties ar dzīvnieku labturības apsvērumiem nav ieteicams testēt dzīvniekus ar VSS 5. kategorijas devām (2 000–5 000 mg/kg), un tās jātestē tikai tādos gadījumos, kad ir lielas iespējas, ka šādu testu rezultāti ir ļoti nepieciešami cilvēku vai dzīvnieku veselības vai vides aizsardzībai.

Gadījumos, kad devu diapazona pētījumā nobeidzas dzīvnieks, kuram pārbaudīta mazākās fiksētās devas (5 mg/kg) iedarbība, parasti pētījumu izbeidz un attiecīgo vielu klasificē VSS 1. kategorijā (kā norādīts 1. papildinājumā). Tomēr, ja ir nepieciešams precīzāks klasifikācijas apstiprinājums, papildus var veikt šādu fakultatīvu procedūru. 5 mg/kg devu ievada vēl otram dzīvniekam. Ja arī šis otrs dzīvnieks nobeidzas, VSS 1. kategorija tiek apstiprināta un pētījumi nekavējoties jāizbeidz. Ja šis otrais dzīvnieks nenobeidzas, 5 mg/kg devu ievada vēl ne vairāk kā trijiem dzīvniekiem. Tā kā ir augsts mirstības risks, ievērojot labturības apsvērumus, šiem dzīvniekiem devu ievada noteiktā secībā. Starplaikam, pēc kāda vielu ievada nākamajam dzīvniekam, ir jābūt pietiekami ilgam, lai varētu konstatēt, ka iepriekšējais dzīvnieks varētu izdzīvot. Ja tiek konstatēts otrs bojāejas gadījums, devu ievadīšanas noteikto secību nekavējoties pārtrauc un deva nevienam dzīvniekam vairāk nav ievadāma. Pēc otrā bojāejas gadījuma (neatkarīgi no dzīvnieku skaita, ar kuriem izdarīti testi testēšanas izbeigšanas laikā) tiek noteikts A rezultāts (divi vai vairāki bojāejas gadījumi) un tiek ievērots 2. papildinājumā noteiktais klasifikācijas noteikums par 5 mg/kg fiksēto devu (1. kategorija, ja ir divi vai vairāki bojāejas gadījumi, vai 2. kategorija, ja tiek konstatēts ne vairāk kā viens bojāejas gadījums). Turklāt 4. papildinājumā ir norādījumi par klasifikāciju ES sistēmā līdz laikam, kamēr tiek ieviesta jaunā VSS sistēma.

1.5.3. **Galvenais pētījums**

1.5.3.1. *Dzīvnieku skaits un devu līmeņi*

Lēmumi, kas jāpieņem pēc testiem ar sākotnējo devu, ir norādīti diagrammās 2. papildinājumā. Jāpieņem kāds no trijiem lēmumiem – testēšanu pārtraukt un piešķirt atbilstošu bīstamības klasi, veikt testus ar augstāko fiksēto devu vai arī ar zemāko fiksēto devu. Tomēr, pamatojoties uz apsvērumiem, kas saistīti ar dzīvnieku aizsardzību, nav jātestē devu līmenis, kas devu diapazona pētījumā ir izraisījis dzīvnieku nobeigšanos (skatīt 2. papildinājumu). Līdzšinējā pieredze liecina, ka ticamākais sākotnējās devas testu rezultāts ir tāds, ka vielu iespējams klasificēt bez jebkādiem papildu testiem.

Katra līmeņa devu testēšanai parasti izmanto pavisam piecus viena dzimuma dzīvniekus. Šo piecu dzīvnieku grupu izvēlas, izmantojot vienu dzīvnieku no devu diapazona pētījuma, kam ievadīta izraudzītā līmeņa deva, un papildus vēl četrus dzīvniekus (izņemot gadījumus, kad galvenajā pētījumā izmantotais devu līmenis nav bijis iekļauts devu diapazona pētījumā, taču parasti tā nav).

Vielas ievadīšanas reižu starplaiku katram devu līmenim nosaka atkarībā no toksiskuma pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Vielas nākamās devas ievadīšana ir jāatliek līdz laikam, kamēr rodas pārliecība par iepriekš devu saņēmušo dzīvnieku izdzīvošanu. Ja vajadzīgs, lai novērotu aizkavētu toksisko iedarbību, ieteicams ievērot trīs līdz četru dienu starplaiku katrai devu līmeņa ievadīšanai. Starplaiku var koriģēt pēc vajadzības, piemēram, gadījumos, kad atbildes reakcija uz vielas iedarbību nav pārliecinoša.

▼B

Ja tiek pieņemts lēmums izmantot augstāko fiksēto devu 5 000 mg/kg, jāievēro 3. papildinājumā noteiktā procedūra (skatīt arī 1.6.2. punktu).

1.5.3.2. *Pieļaujamības tests*

Pieļaujamības testu galvenokārt izmanto gadījumos, kad eksperimenta veicēja rīcībā ir informācija, kas liecina, ka vielai, iespējams, nav toksiskas iedarbības, t. i., tā ir toksiska tikai devās, kas ierobežotas ar reglamentējošām pieļaujamības devām. Informāciju par testējamās vielas toksiskumu var iegūt pēc testu datiem ar līdzīgiem maisījumiem vai produktiem, ņemot vērā identitāti un to komponentu īpatsvaru, kuru toksiskums ir zināms. Šādās situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī sagaidāms, ka testējamā viela varētu būt toksiska, ir jāveic galvenais tests.

Izmantojot parasto procedūru, devu diapazona pētījuma sākotnējo devu 2 000 mg/kg (vai izņēmuma gadījumā 5 000 mg/kg) ievada papildu četriem dzīvniekiem, ko izmanto pieļaujamības testam saskaņā ar šiem norādījumiem.

1.6. NOVĒROJUMI

Pēc ievadīšanas pirmo 30 minūšu laikā dzīvniekus individuāli novēro vismaz vienreiz, pirmo 24 stundu laikā periodiski, īpašu uzmanību veltot pirmajām četrām stundām un pēc tam reizi dienā, pavisam 14 dienas, izņemot gadījumus, kad tie gājuši bojā vai pētījumi jāizbeidz, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ tos humāni nonāvējot. Tomēr novērošanas ilgums nav stingri jānosaka. Tas jānosaka pēc toksiskuma reakcijām, to parādīšanās laika un atveseļošanās ilguma, un tādēļ novērojumu ilgumu var pagarināt, ja ir vajadzīgs. Laiki, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, ir svarīgi, īpaši, ja tām ir tendence aizkavēties (11). Visus novērojumus regulāri reģistrē, par katru dzīvnieku izdarot individuālus reģistrus.

Ja dzīvnieki turpina uzrādīt toksiskas iedarbības pazīmes, ir vajadzīgi papildu novērojumi. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Uzmanība jāpievērš drebuļu, krampju, siekalošanās, caurejas, letarģijas, miega un komas novērojumiem. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kas izrāda lielu sāpju un ilgstošu briesmu sajūtu pazīmes, ir humāni jānonāvē. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti nobeigušies, iespējami precīzi jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

1.6.1. **Ķermeņa svars**

Visi dzīvnieki jānosver neilgi pirms testējamās vielas ievadīšanas un pēc tam vismaz reizi nedēļā. Svara izmaiņas ir jāaprēķina un jāreģistrē. Testu beigās izdzīvojušos dzīvniekus nosver, tad humāni nonāvē.

▼B

1.6.2. **Patoloģija**

Visiem testa dzīvniekiem (arī tiem, kuri testa laikā nobeigušies vai ar kuriem dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ pētījumi izbeigti) ir jāizdara pilna autopsija. Visas makroskopiskās patoloģiskās izmaiņas jāreģistrē par katru dzīvnieku. Var apsvērt arī orgānu, kuros parādās makroskopiskās patoloģijas pierādījumi, mikroskopisko izmeklēšanu dzīvniekiem, kas pēc sākotnējās devas izdzīvojuši 24 stundas vai ilgāk, jo tāda apskate var sniegt noderīgu informāciju.

2. **DATI**

Norāda datus par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati ir jāapkopo tabulas veidā, norādot dzīvnieku skaitu, kas izmantots katrā testa grupā, dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās toksiskuma pazīmes, dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķo dzīvnieku nobeigšanās laiku, toksiskās iedarbības veidu un to atgriezeniskuma aprakstu un gaitu, kā arī autopsijā iegūtos novērojumus.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikāli ķīmiskās īpašības (tostarp izomerizācija),

— identifikācijas dati, tostarp *CAS* numurs.

Nesējs (ja vajadzīgs):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku mikrobioloģiskais statuss, ja tas zināms,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums (tostarp, ja vajadzīgs, vīrišķā dzimuma īpatņu izmantošanu sievišķā dzimuma īpatņu vietā),

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.

Testa apstākļi:

— sīkas ziņas par testējamās vielas preparātu, tostarp dati par ievadītā materiāla fizikālo formu,

— sīkas ziņas par testējamās vielas ievadīšanu, iekļaujot dozēšanas tilpumus un dozēšanas laikus,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (iekļaujot veidu/izcelsmi, ūdens avotu),

— sākotnējās devas izvēles pamatojums.

▼B

Rezultāti:

— datu tabula par atbildes reakcijām un devu līmeņiem (t. i., dzīvniekiem, kas uzrādījuši toksiskuma pazīmes, tostarp nobeigšanās gadījumus, iedarbības veidu, smagumu un ilgumu),

— datu tabula par ķermeņa svaru un ķermeņa svara izmaiņām,

— katra dzīvnieka svars ievadīšanas dienā un pēc tam ar nedēļas starplaikiem, kā arī nobeigšanās vai nonāvēšanas laikā,

— nobeigšanās datums un laiks, ja tā notikusi pirms paredzētās nonāvēšanas,

— toksiskuma pazīmju parādīšanās gaita katram dzīvniekam, un vai tās ir bijušas atgriezeniskas,

— katra dzīvnieka autopsijas konstatācijas un histopatoloģiskās konstatācijas, ja tās pieejamas.

Rezultātu apspriešana un interpretācija.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 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, p. 279–291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, 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, p. 469–482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, p. 313–324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol., 14, p. 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, p. 183–196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(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

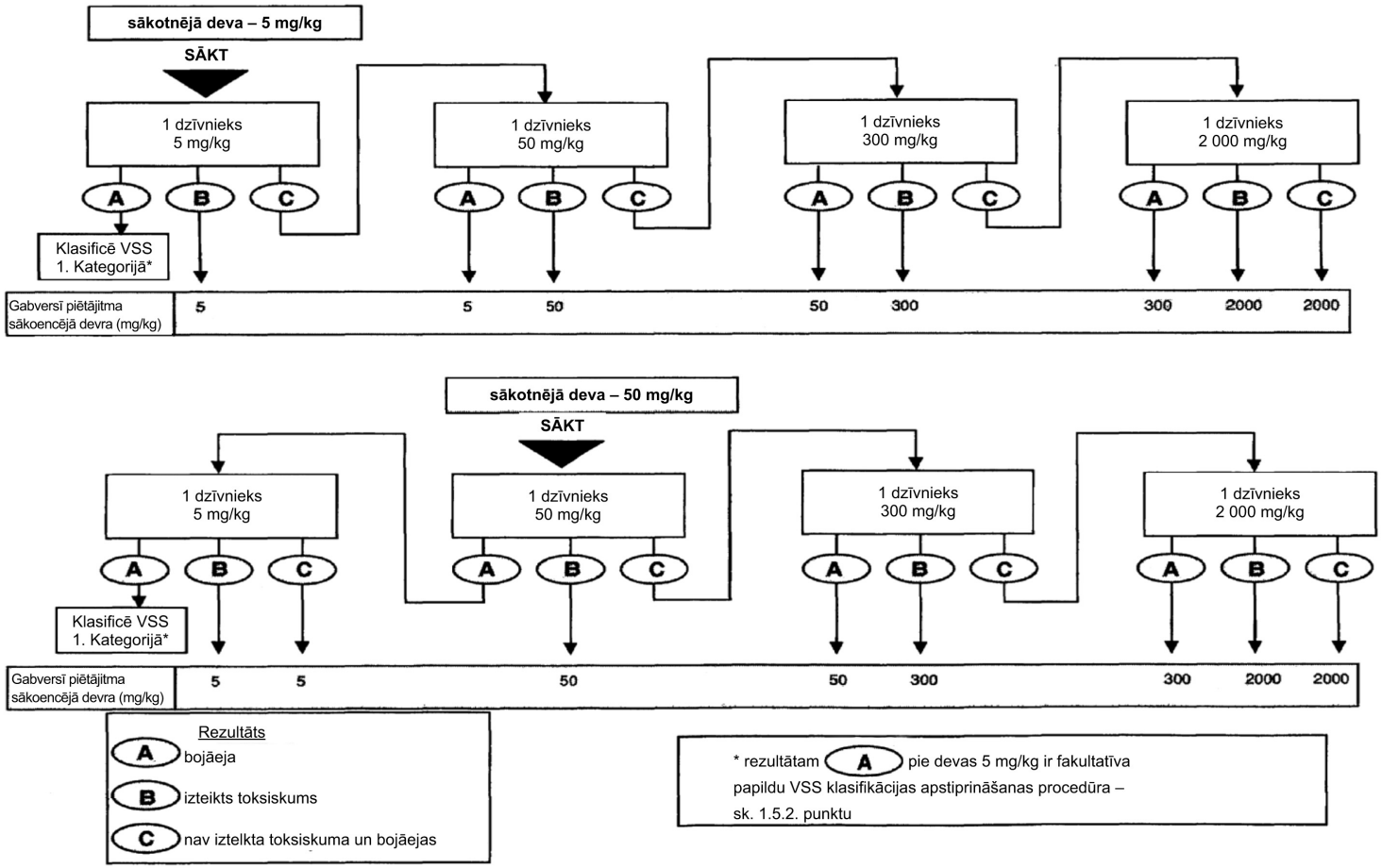
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(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, 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.

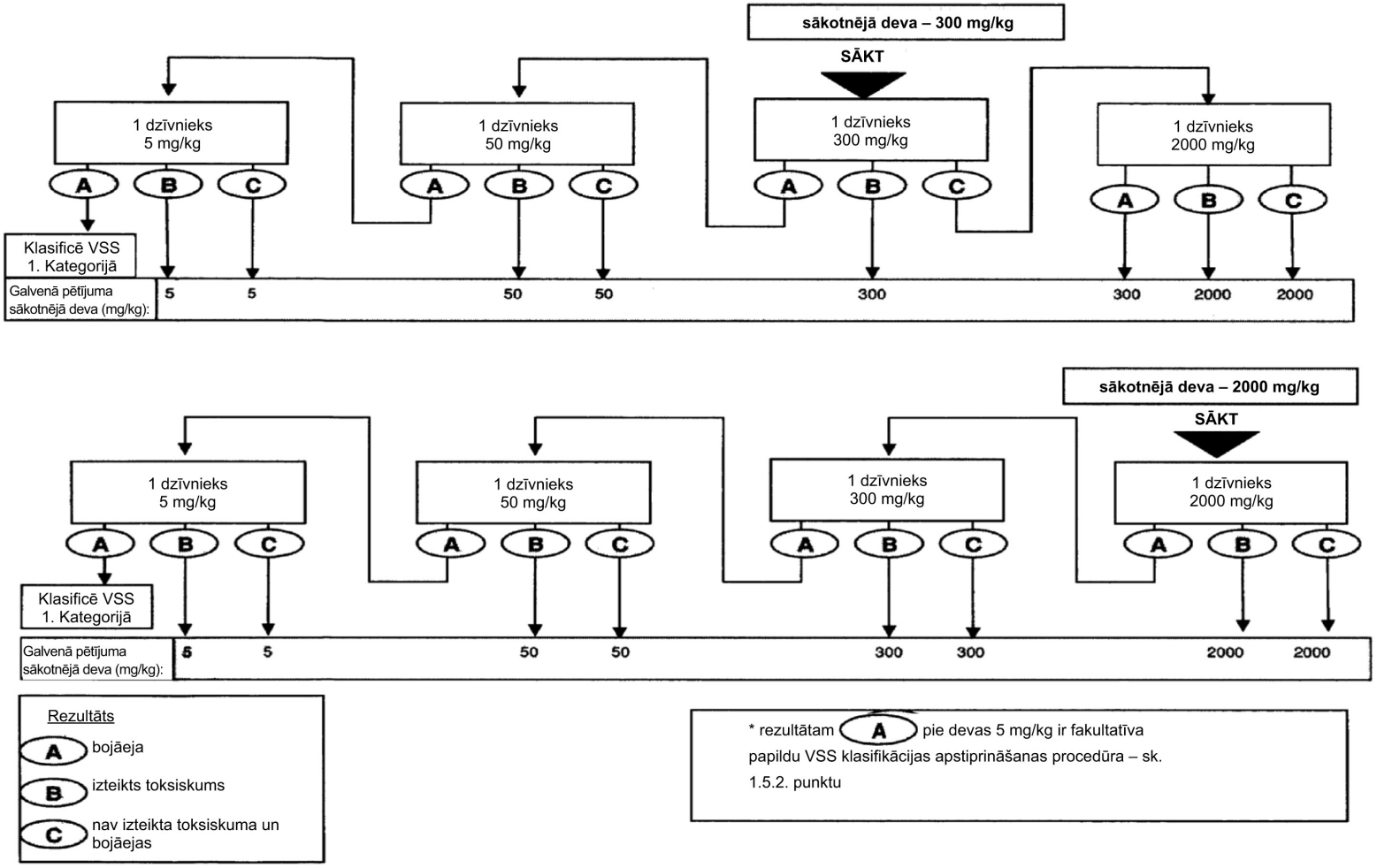
(11) Chan P.K and Hayes, A.W. (1994). Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

1. PAPILDINĀJUMS

DEVU DIAPAZONA PĒTĪJUMU DIAGRAMMA

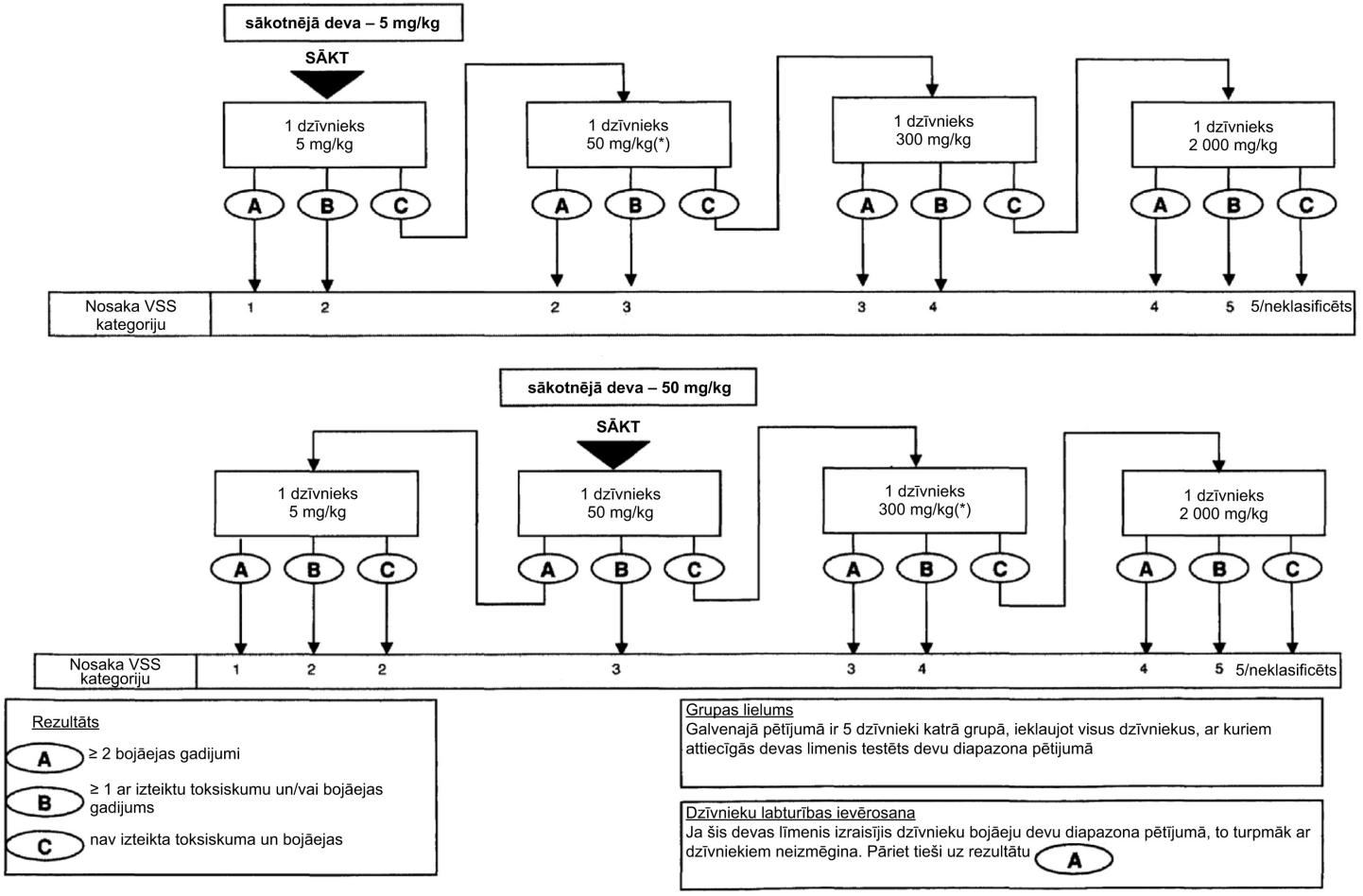


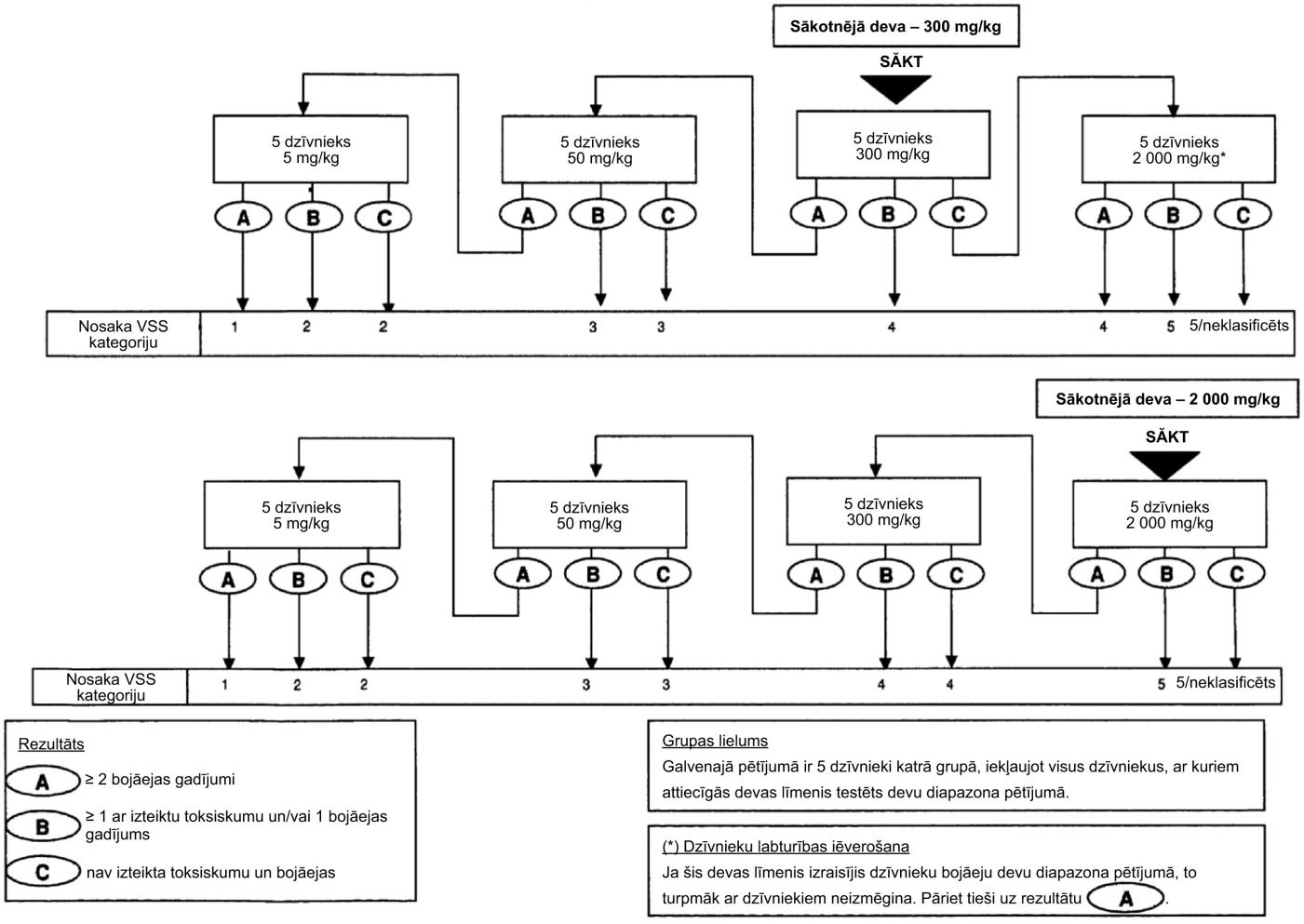
▼B


sākotnējā deva – 300 mg/kg
SĀKT
1 dzīvnieks 5 mg/kg
1 dzīvnieks 50 mg/kg
1 dzīvnieks 300 mg/kg
1 dzīvnieks 2000 mg/kg
A
B
C
Klasificē VSS 1. Kategorijā
Galvenā pētījuma sākotnējā deva (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
sākotnējā deva – 2000 mg/kg
SĀKT
1 dzīvnieks 5 mg/kg
1 dzīvnieks 50 mg/kg
1 dzīvnieks 300 mg/kg
1 dzīvnieks 2000 mg/kg
Klasificē VSS 1. Kategorijā
Galvenā pētījuma sākotnējā deva (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Rezultāts
A bojāeja
B izteikts toksiskums
C nav izteikta toksiskuma un bojāejas
* rezultātam A pie devas 5 mg/kg ir fakultatīva papildu VSS klasifikācijas apstiprināšanas procedūra – sk. 1.5.2. punktu

2. PAPILDINĀJUMS

GALVENĀ PĒTĪJUMA DIAGRAMMA




Sākotnējā deva – 300 mg/kg
SĀKT
5 dzīvnieks 5 mg/kg
5 dzīvnieks 50 mg/kg
5 dzīvnieks 300 mg/kg
5 dzīvnieks 2 000 mg/kg*
A B C
Nosaka VSS kategoriju
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasificēts
Sākotnējā deva – 2 000 mg/kg
SĀKT
5 dzīvnieks 5 mg/kg
5 dzīvnieks 50 mg/kg
5 dzīvnieks 300 mg/kg
5 dzīvnieks 2 000 mg/kg
A B C
Nosaka VSS kategoriju
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasificēts
Rezultāts
A ≥ 2 bojāejas gadījumi
B ≥ 1 ar izteiktu toksiskumu un/vai 1 bojāejas gadījums
C nav izteikta toksiskumu un bojāejas
Grupas lielums
Galvenajā pētījumā ir 5 dzīvnieki katrā grupā, iekļaujot visus dzīvniekus, ar kuriem attiecīgās devas līmenis testēts devu diapazona pētījumā.
(*) Dzīvnieku labturības ievērošana
Ja šis devas līmenis izraisījis dzīvnieku bojāeju devu diapazona pētījumā, to turpmāk ar dzīvniekiem neizmēgina. Pāriet tieši uz rezultātu A.

▼B

3.PAPILDINĀJUMS

KLASIFIKĀCIJAS KRITĒRIJI TESTĒJAMAJĀM VIELĀM AR PAREDZAMAJĀM LD_{50} VĒRTĪBĀM VIRS 2 000 MG/KG, NEVEICOT TESTUS

Kritēriji, kas noteikti 5. bīstamības kategorijai, ir vērsti uz tādu testējamo vielu identifikāciju, kurām gan ir relatīvi zems akūtais toksiskums, tomēr zināmos apstākļos tās var būt jutīgām populācijām bīstamas. Šo vielu paredzamā LD_{50}, ievadot caur muti vai uzsūcoties caur ādu, ir 2 000–5 000 mg/kg vai citiem ievadīšanas veidiem tām līdzvērtīgas devas. Testējamās vielas var iedalīt šajā bīstamības kategorijā, kas noteikta – 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (VSS 5. kategorija) šādos gadījumos:

a) ja šī kategorija noteikta pēc kādas no 2. papildinājumā norādītajām testēšanas shēmām, pamatojoties uz bojāejas gadījumiem;

b) ja ir ticami pierādījumi, kas norāda, ka LD_{50} ir 5. kategorijai noteiktajā vērtību diapazonā, vai pētījumi ar citiem dzīvniekiem, vai arī toksiskā iedarbība uz cilvēka organismu ir tāda, ka tai ir akūtas iedarbības raksturs;

c) izmantojot datu ekstrapolāciju, aprēķinu vai mērījumu metodes, ja nav nepieciešams piešķirt augstāku bīstamības kategoriju, un

— ir pieejama ticama informācija, kas liecina par būtisku toksisku iedarbību uz cilvēka organismu, vai

— novēroti bojāejas gadījumi, veicot testēšanu līdz 4. kategorijas vērtībām, ievadot orāli, vai

— ja, veicot testēšanu līdz 4. kategorijas vērtībām, izņemot caureju, piloerekciju vai izskatu ekspertu slēdziens apstiprina būtiskas klīniskas toksiskuma pazīmes, vai

— ja ekspertu slēdziens apstiprina ticamu citos pētījumos iegūtu informāciju par būtisku toksisku iedarbību uz dzīvniekiem.

TESTĒŠANA AR DEVĀM VIRS 2 000 MG/KG

Papildu nemainīgās devas līmeni 5 000 mg/kg var izmantot izņēmuma gadījumos un tikai tad, kad tā ir pamatota ar īpašām reglamentējošām prasībām. Sakarā ar nepieciešamību ievērot dzīvnieku labturības prasības nav ieteicams veikt testēšanu ar devām, kas pārsniedz 5 000 mg/kg, un tie jāveic tikai tādos gadījumos, kad ir ļoti lielas iespējas, ka tie ir tieši saistīti ar dzīvnieku aizsardzību vai cilvēku veselības aizsardzību (9).

Devu diapazona pētījums

Noteikumi par lēmumu pieņemšanu attiecībā uz 1. papildinājumā noteikto pakāpenisko procedūru tiek paplašināti, iekļaujot devu līmeni 5 000 mg/kg. Tādējādi, ja devu diapazona pētījumā izmanto sākotnējo devu 5 000 mg/kg, iegūstot rezultātu A (bojāeja), ir jāveic testi ar otru dzīvnieku, testējot devu līmeni 2 000 mg/kg; iegūstot rezultātus B un C (izteikts toksiskums vai nav toksiskas iedarbības), galvenajā pētījumā par sākotnējo devu var izmantot 5 000 mg/kg. Līdzvērtīgi, ja izmanto sākotnējo devu, kas nav 5 000 mg/kg, testus veic ar devām līdz 5 000 mg/kg, ja ar devu 2 000 mg/kg iegūst rezultātus B vai C; pēc tam 5 000 mg/kg testēšanas rezultāts A nosaka, ka galvenā pētījuma sākotnējā deva ir 2 000 mg/kg, bet rezultāti B un C nosaka, ka galvenā pētījuma sākotnējā deva ir 5 000 mg/kg.

▼B

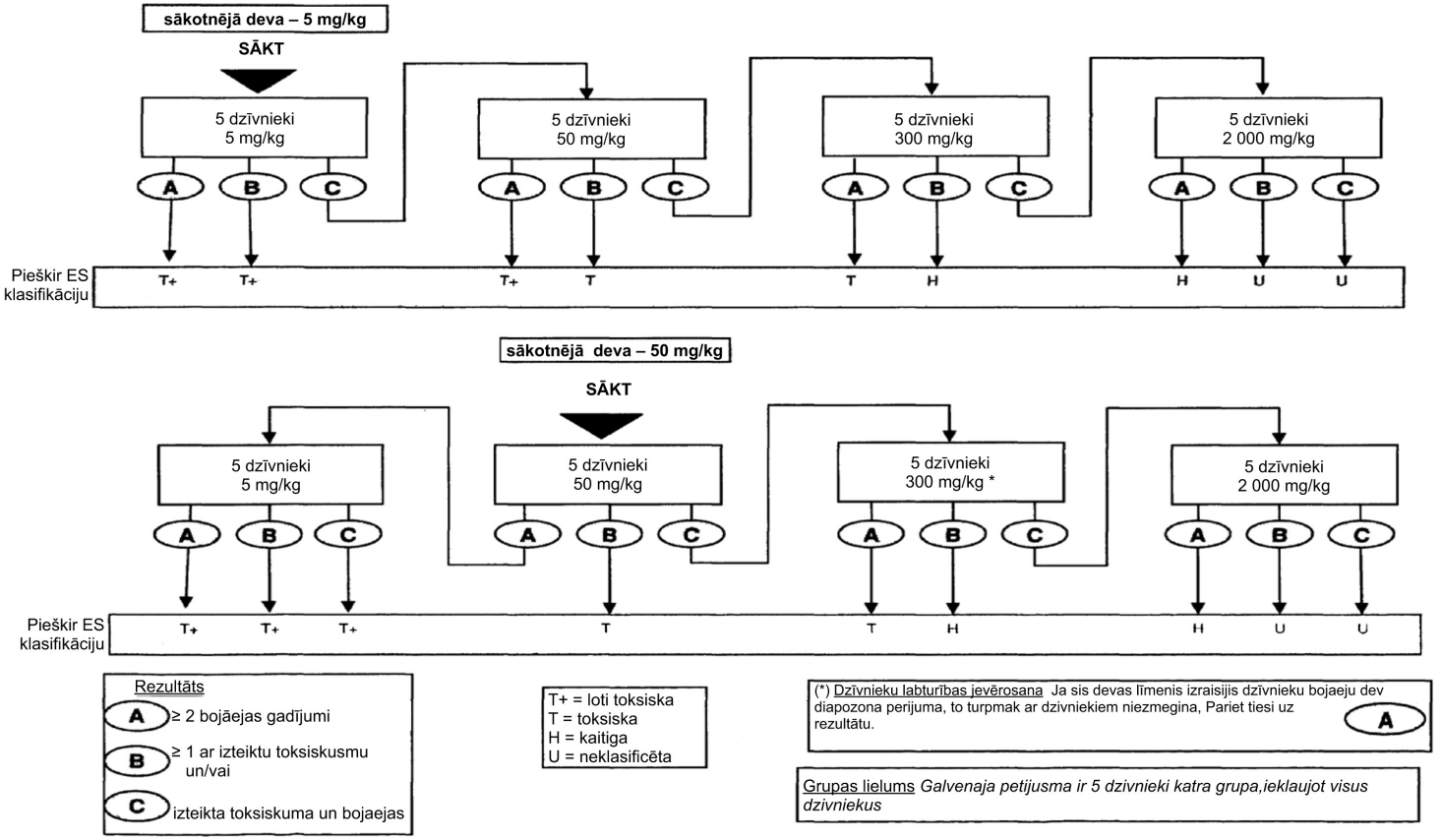
Galvenais pētījums

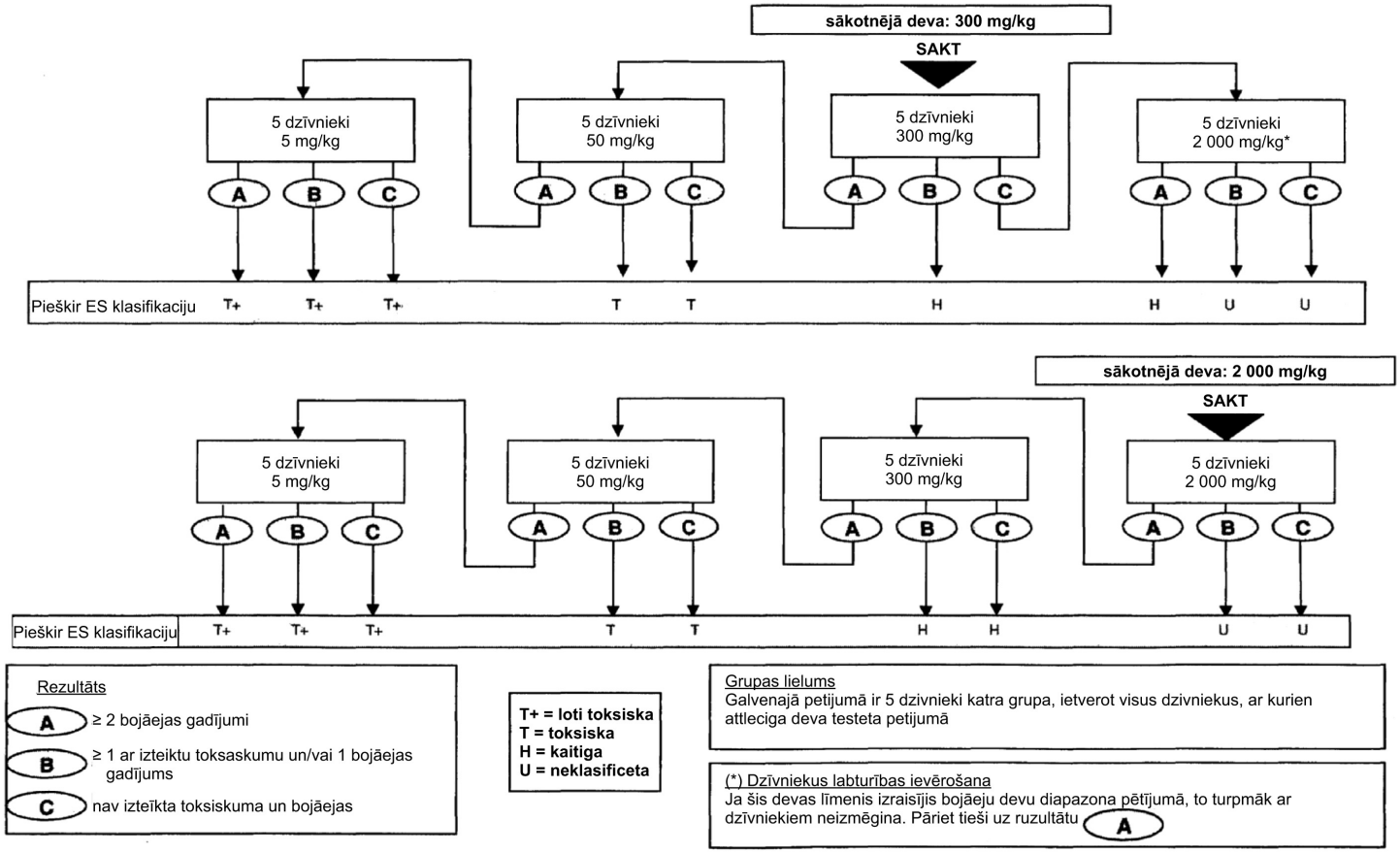
Noteikumi par lēmumu pieņemšanu attiecībā uz 2. papildinājumā noteikto secīgo procedūru tiek paplašināti, iekļaujot devu līmeni 5 000 mg/kg. Tādējādi, ja devu diapazona pētījumā izmanto sākotnējo devu 5 000 mg/kg, iegūstot rezultātu A (≥ 2 bojāejas gadījumi), ir jāveic testi ar otru grupu, testējot devu līmeni 2 000 mg/kg; iegūstot rezultātu B (izteikts toksiskums un/vai ≤ 1 bojāejas gadījums) vai C (nav toksiskas iedarbības), vielu saskaņā ar VSS neklasificē. Līdzvērtīgi, ja izmanto sākotnējo devu, kas nav 5 000 mg/kg, testus veic ar devām līdz 5 000 mg/kg, ja ar devu 2 000 mg/kg iegūst rezultātu C; ja pēc tam ar devu 5 000 mg/kg iegūst rezultātu A, viela pieskaitāma VSS 5. kategorijai, bet, iegūstot rezultātus B vai C, vielu saskaņā ar VSS neklasificē.

4. PAPILDINĀJUMS

TESTA METODE B.1.a

Norādījumi par klasifikāciju saskaņā ar ES sistēmu pārejas perioda laikā līdz Vispārējās saskaņotās sistēmas (VSS) pilnīgai īstenošanai (literatūras saraksts (8)))




sākotnējā deva: 300 mg/kg
SAKT
5 dzīvnieki 5 mg/kg
5 dzīvnieki 50 mg/kg
5 dzīvnieki 300 mg/kg
5 dzīvnieki 2 000 mg/kg*
A B C
Pieškir ES klasifikaciju T+ T+ T+ T T H H U U
sākotnējā deva: 2 000 mg/kg
SAKT
5 dzīvnieki 5 mg/kg
5 dzīvnieki 50 mg/kg
5 dzīvnieki 300 mg/kg
5 dzīvnieki 2 000 mg/kg
Pieškir ES klasifikaciju T+ T+ T+ T T H H U U
Rezultāts
A ≥ 2 bojāejas gadījumi
B ≥ 1 ar izteiktu toksaskumu un/vai 1 bojāejas gadījums
C nav izteīkta toksiskuma un bojāejas
T+ = loti toksiska
T = toksiska
H = kaitiga
U = neklasificeta
Grupas lielums
Galvenajā petijumā ir 5 dzivnieki katra grupa, ietverot visus dzivniekus, ar kurien attleciga deva testeta petijumā
(*) Dzīvniekus labturības ievērošana
Ja šis devas līmenis izraisījis bojāeju devu diapazona pētījumā, to turpmāk ar dzīvniekiem neizmēgina. Pāriet tieši uz ruzultātu A

▼B

B.1.b **AKŪTS PERORĀLS TOKSISKUMS – AKŪTA TOKISKUMA KLASES METODE**

1. **METODE**

Šī testa metode ir līdzvērtīga ESAO 423. (2001) vadlīnijā noteiktajai metodei.

1.1. IEVADS

Šajā testā norādītā akūtā toksiskuma klases noteikšanas metode (1) ir posmveida procedūra, kuras katrā posmā izmanto trīs viena dzimuma dzīvniekus. Atkarībā no dzīvnieku mirstības un/vai mirstošo dzīvnieku skaita testējamās vielas akūtā toksiskuma noteikšanai vidēji var būt vajadzīgi 2–4 posmi. Šī procedūra ir reproducējama, tajā izmanto ļoti nelielu skaitu dzīvnieku, un pēc tās iespējams vielas klasificēt līdzvērtīgi kā pēc citām akūtā toksiskuma noteikšanas metodēm. Akūtā toksiskuma klases noteikšanas metodes pamatā ir biometriski novērtējumi (2) (3) (4) (5) ar fiksētām devām, kas ir atbilstoši atdalītas tā, lai vielu varētu novērtēt gan klasifikācijas vajadzībām, gan bīstamības noteikšanai. Kopš tās pieņemšanas 1996. gadā metode plaši *in vivo* validēta gan valstu līmenī (6), gan starptautiski (7) salīdzinājumā ar datiem, kas iegūti no literatūras.

Norādījumi par katrā konkrētā gadījumā piemērotāko testa metodi atrodami pamatnostādnēs par akūtā perorālā toksiskuma testēšanu *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (8). Šajās pamatnostādnēs ir arī papildu informācija par testēšanas metodes B.1.b veikšanu un pēc tās iegūto rezultātu interpretāciju.

Testējamās vielas devās, par kurām ir zināms, ka tās izraisa izteiktas sāpju un briesmu sajūtas kodīgo vai stipri kairinošo īpašību dēļ, nav jāievada. Bojā ejoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas briesmu sajūtas, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testēšanas rezultātus, tie jāņem vērā tieši tāpat kā testos nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt bojā ejošus dzīvniekus vai dzīvniekus, kuriem ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos doti citās atsevišķās pamatnostādnēs (9).

Metodē izmanto iepriekš noteiktas fiksētas devas, un pēc tās iegūtie rezultāti dod iespējas vielas ar akūti toksisku iedarbību novērtēt un klasificēt saskaņā ar Vispārējo saskaņoto ķīmisko vielu klasifikāciju (10).

Šī metode principā nav paredzēta precīzai LD_{50} aprēķināšanai, bet ļauj noteikt iedarbības diapazonu, kurā ir sagaidāms letāls iznākums, jo šā testa galvenais beigu punkts ir kādas testa dzīvnieku daļas nobeigšanās. Pēc šīs metodes LD_{50} vērtību var noteikt tikai tādos gadījumos, kad vismaz divas devas izraisa nobeigšanos, kas ir augstāka nekā 0 % un zemāka nekā 100 %. Izmantojot iepriekš noteiktas devas, kas nav atkarīgas no konkrētās testējamās vielas, tās klasifikāciju tieši saistot ar dažādos stāvokļos novēroto dzīvnieku skaitu, uzlabo dažādās laboratorijās iegūto rezultātu atbilstību un atkārtojamību.

▼B

Pirms sākt pētījumus, testēšanas laboratorijai jāņem vērā visa par testējamo vielu pieejamā informācija. Pie šādas informācijas pieder tās identifikācija un ķīmiskā struktūra, fizikāli ķīmiskās īpašības, citu *in vitro* vai *in vivo* veikto toksiskuma testu rezultāti, toksikoloģiskie dati par struktūras ziņā līdzīgām vielām, vielas paredzamais(-ie) izmantošanas veids(-i). Šī informācija ir vajadzīga, lai nodrošinātu, ka testi tiek veikti cilvēku veselības aizsardzībai piemērotā veidā un tiek pareizi izraudzīta sākotnējā deva.

1.2. DEFINĪCIJAS

Akūts perorāls toksiskums: kaitīgā iedarbība, kāda ir 24 stundu laikā pēc vienas vai vairāku vielas devu ievadīšanas caur muti.

Aizkavēta nāve ir tad, ja dzīvnieks 48 stundu laikā nav nobeidzies vai neizbēgami nav gājis bojā, bet nobeidzas vēlāk 14 dienu novērošanas perioda laikā.

Deva: ievadītās testējamās vielas daudzums. Devu izsaka testējamās vielas svara veidā uz testa dzīvnieka svara vienību (piemēram, mg/kg).

VSS: Vispārējā saskaņotā ķīmisko vielu un maisījumu klasifikācijas sistēma. Kopīgs ESAO (veselības un vides aizsardzība), ANO Bīstamo kravu pārvadājumu ekspertu komitejas (fizikāli ķīmiskās īpašības) un *ILO* – Starptautiskās Darba organizācijas (kaitīguma paziņošana) – pasākums, ko koordinē Ķīmisko vielu drošas apsaimniekošanas starporganizāciju programma (*IOMC*).

Neizbēgama nāve ir tad, ja miršana vai nāves iestāšanās sagaidāma pirms nākamā plānotā novērojumu laika. Pazīmes, kas liecina par šā stāvokļa iestāšanos grauzējiem var būt konvulsijas, gulēšana uz sāniem vai augšpēdus un drebēšana. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (9).)

LD_{50} (vidējā letālā deva): statistiski noteikta vielas deva, kas, ievadot perorāli, var izraisīt 50 % dzīvnieku nobeigšanos. LD_{50} vērtību izsaka kā testējamās vielas svaru uz testa dzīvnieku svara vienību (mg/kg).

Robeždeva attiecas uz devas augšējo ierobežojumu testā (2 000 vai 5 000 mg/kg).

Mirstošs: atrašanās stāvoklī, kad mirst vai nav iespēju izdzīvot, arī saņemot ārstēšanu. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (9).)

Prognozējama nāve: klīniskās pazīmes, kas liecina par nāves iestāšanos pēc zināma laika, nesagaidot eksperimenta plānotās beigas, piemēram, nespēja sasniegt ūdeni vai barību. (Sīkāk skatīt *Humane Endpoint Guidance Document* (9).)

▼B

1.3. METODES PRINCIPS

Metodes princips ir tāds, ka, pamatojoties uz posmveida procedūru, kuras katrā posmā izmanto minimālu skaitu dzīvnieku, tiek iegūta klasifikācijai pietiekama informācija par testējamās vielas akūto toksiskumu. Vielu izmēģinājuma dzīvnieku grupai ievada perorāli vienā no noteiktajām devām. Vielu testē, izmantojot posmveida procedūru, katrā posmā izmanto trīs viena (parasti sievišķā) dzimuma dzīvniekus. Ar vielu saistīta testa dzīvnieku bojāeja vai tās neesamība nosaka nākamo posmu, t. i.:

— turpmāka testēšana nav vajadzīga,

— to pašu devu ievada vēl trijiem dzīvniekiem,

— vēl trijiem dzīvniekiem ievada nākamo augstāko vai zemāko devu.

Testa procedūra sīkāk aprakstīta 1. papildinājumā. Metode dod iespējas testējamo vielu novērtēt, to klasificējot kādā no toksiskuma klasēm, kas noteiktas pēc fiksētām LD_{50} robežvērtībām.

1.4. METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Ieteicamākā grauzēju suga ir žurkas, lai gan var izmanot arī citas grauzēju sugas. Parasti izmanto sieviešu dzimuma īpatņus (9). Tas tāpēc, ka parasto LD_{50} testu literatūras apskati liecina, ka abu dzimumu jutība daudz neatšķiras, taču gadījumos, kad tā ir atšķirīga, sieviešu dzimuma īpatņi parasti ir nedaudz jutīgāki (11). Tomēr, ja dati par struktūras ziņā līdzīgu vielu toksikoloģiskajām un toksikokinētiskajām īpašībām liecina, ka uz testējamās vielas iedarbību tēviņi varētu būt jutīgāki, tests jāveic ar vīriešu dzimuma īpatņiem. Ja testu veic ar vīrišķā dzimuma īpatņiem, tas ir jāpamato.

Ir jāizmanto jauni, veseli, pieauguši parasti izmantojamo laboratorijas līniju dzīvnieki. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Visiem testa dzīvniekiem testēšanas sākumā jābūt 8 līdz 12 nedēļas veciem, un to ķermeņa svaram jābūt ± 20 % no testiem iepriekš izmantoto dzīvnieku vidējā svara.

1.4.2. **Turēšanas un barošanas nosacījumi**

Telpā, kurā tur izmēģinājumu dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Dzīvniekus būros var turēt grupās atbilstoši devai, bet to skaits vienā būrī nedrīkst apgrūtināt katra dzīvnieka novērošanu.

▼B

1.4.3. **Dzīvnieku sagatavošana**

Veselus, pieaugušus, jaunus dzīvniekus izvēlas izlases veidā, marķē individuālai identificēšanai un tur būros vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma sākuma, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

1.4.4. **Devu sagatavošana**

Parasti testējamās vielas jāievada visām pārbaudāmajām devām vienādā tilpumā, mainot ievadāmā preparāta koncentrāciju. Taču, ja jātestē galaprodukts, kas ir šķidrums vai maisījums, vielas bīstamības novērtēšanai tā var būt jāizmanto neatšķaidītā veidā, t. i., ar nemainīgu koncentrāciju, un tā ir arī dažu reglamentējošo iestāžu prasība. Jebkurā gadījumā nedrīkst pārsniegt ievadāmo devas maksimālo tilpumu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Žurkām tas parasti nedrīkst pārsniegt 1ml/100 g ķermeņa svara; tomēr ūdens šķīdumus var ievadīt līdz 2 ml/100 g ķermeņa svara. Ņemot vērā ievadāmā preparāta sastāvu, vienmēr, kad iespējams, ieteicams izmantot šķīdumu/suspensiju/emulsiju ūdenī, ja ne, tad šķīdumu/suspensiju/emulsiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā) un tikai pēc tam šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, jānoskaidro tā toksiskās īpašības. Ja nav datu par preparāta pietiekamu stabilitāti visā tā lietošanas laikā, devas jāsagatavo neilgi pirms ievadīšanas.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Devu ievadīšana**

Testējamo vielu dzīvniekiem ievada vienā devā, mākslīgi barojot, izmantojot kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas kanulu. Ja kādu apstākļu dēļ ievadīt vienā devā nav iespējams, to var dot mazākās daļās laika posmā, kas nepārsniedz 24 stundas.

Dzīvniekus pirms devu ievadīšanas nebaro (piemēram, žurkas pārtrauc barot iepriekšējā dienā, dodot tikai dzert, bet peles – 3–4 stundas pirms devu ievadīšanas). Pirms ievadīt testējamo vielu pēc nebarošanas perioda, dzīvnieki ir jānosver. Pēc testējamās vielas ievadīšanas žurkas var nebarot vēl 3–4 stundas, bet peles – 1–2 stundas. Ja vielas devu ievada pa daļām kādā laika posmā, atkarībā no tā ilguma var gadīties, ka dzīvnieki ir jānodrošina ar barību un ūdeni.

1.5.2. **Dzīvnieku skaits un devu līmeņi**

Katrā posmā izmato trīs dzīvniekus. Devas līmeni, ko izmanto par sākotnējo devu, izvēlas kā vienu no četriem noteiktiem līmeņiem, t. i., 5, 50, 300 un 2 000 mg/kg ķermeņa svara. Sākotnējam devas līmenim jābūt tādam, kas ar lielu varbūtību varētu izraisīt vismaz dažu devu saņēmušo dzīvnieku bojāeju. Diagrammās 1. papildinājumā norādīta procedūra, kas jāievēro atkarībā no sākotnējās devas. Papildus 4. papildinājumā ir norādījumi par klasifikāciju ES sistēmā līdz laikam, kamēr tiek ieviesta jaunā VSS sistēma.

▼B

Ja pieejamā informācija liek domāt, ka pie lielākā sākotnējās devas līmeņa (2 000 mg/kg ķermeņa svara) mirstība ir mazticama, tad ir jāizdara pieļaujamības tests. Ja par testējamo vielu nav informācijas, dzīvnieku labturības dēļ ir ieteicams izmantot sākotnējo devu 300 mg/kg ķermeņa svara.

Laika intervālu starp vielas atkārtotu ievadīšanu izmēģinājumu dzīvnieku grupām nosaka atkarībā no toksiskuma pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Vielas nākamās devas ievadīšana ir jāatliek līdz laikam, kamēr rodas pārliecība par iepriekš devu saņēmušo dzīvnieku izdzīvošanu.

Augšējo devu 5 000 mg/kg ķermeņa svara var izmantot tikai izņēmuma gadījumos, kad tā ir pamatota ar īpašām reglamentējošām prasībām (skatīt 2. papildinājumu). Pamatojoties ar dzīvnieku labturības apsvērumiem nav ieteicams ar dzīvniekiem izmēģināt VSS 5. kategorijas devas (2 000–5 000 mg/kg), un tās jātestē tikai tādos gadījumos, ja ir lielas iespējas, ka šādu testu rezultāti ir ļoti nepieciešami cilvēku vai dzīvnieku veselības vai vides aizsardzībai.

1.5.3. **Pieļaujamības tests**

Pieļaujamības testu galvenokārt izmanto gadījumos, kad eksperimenta veicēja rīcībā ir informācija, kas liecina, ka vielai varētu nebūt toksiskas iedarbības, t. i., tā ir toksiska tikai devās, kas ierobežotas ar reglamentējošiem dokumentiem. Informāciju par testējamā materiāla toksiskumu var iegūt pēc testu datiem ar līdzīgiem maisījumiem vai produktiem, ņemot vērā identitāti un to sastāvdaļu procentuālo īpatsvaru, kuru toksiskums ir zināms. Šādās situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī paredzams, ka testējamā viela varētu būt toksiska, ir jāveic galvenais tests.

Pieļaujamības testu pie viena devas līmeņa 2 000 mg/kg ķermeņa svara var izdarīt ar sešiem dzīvniekiem (katrā posmā pa trijiem). Izņēmuma gadījumos pieļaujamības testu var veikt ar devu 5 000 mg/kg ķermeņa svara, izmantojot trīs dzīvniekus (skatīt 2. papildinājumu). Ja tiek konstatēta ar vielas ievadīšanu saistīta bojāeja, var būt nepieciešams veikt nākamās zemākās devas testus.

1.6. NOVĒROJUMI

Pēc ievadīšanas pirmo 30 minūšu laikā dzīvniekus individuāli novēro vismaz vienreiz, pirmo 24 stundu laikā periodiski, īpašu uzmanību veltot pirmajām četrām stundām, un pēc tam reizi dienā, pavisam 14 dienas, izņemot gadījumus, kad dzīvnieki gājuši bojā vai pētījumi jāizbeidz, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ tos humāni nonāvējot. Tomēr novērošanas ilgums nav stingri jānosaka. Tas ir jānosaka pēc toksiskās iedarbības reakcijām, to parādīšanās laika un atveseļošanās ilguma, un tādēļ ilgumu var pagarināt, ja uzskata par vajadzīgu. Laiki, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, ir svarīgi, īpaši, ja tām ir tendence aizkavēties (12). Visus novērojumus sistemātiski reģistrē, par katru dzīvnieku izdarot individuālu reģistrēšanu.

▼B

Ja dzīvniekiem turpinās toksiskās iedarbības pazīmes, ir vajadzīgi papildu novērojumi. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Uzmanība jāpievērš drebuļu, krampju, siekalošanās, caurejas, letarģijas, miega un komas novērojumiem. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Humane Endpoints Guidance Document* (9). Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kas izrāda lielu sāpju un ilgstošu briesmu sajūtu pazīmes, ir humāni jānonāvē. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nobeigšanās laiks.

1.6.1. **Ķermeņa svars**

Visi dzīvnieki jānosver neilgi pirms testējamās vielas ievadīšanas un pēc tam vismaz reizi nedēļā. Svara izmaiņas ir jāaprēķina un jāreģistrē. Testa beigās pirms humānas nonāvēšanas izdzīvojušos dzīvniekus nosver.

1.6.2. **Patoloģija**

Visiem testa dzīvniekiem (arī tiem, kuri testa laikā nobeigušies vai ar kuriem dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ pētījumi izbeigti) ir jāveic pilna autopsija. Visas patoloģiskās izmaiņas reģistrē par katru dzīvnieku. Var apsvērt arī orgānu, kuros parādās visas patoloģijas pierādījumi, mikroskopisko izmeklēšanu dzīvniekiem, kas izdzīvojuši 24 stundas vai ilgāk, jo tāda apskate var sniegt noderīgu informāciju.

2. **DATI**

Norāda datus par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati ir jāapkopo tabulas veidā, norādot dzīvnieku skaitu, kas izmantots katrā testa grupā, dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās toksiskuma pazīmes, dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķo dzīvnieku nobeigšanās laiku, toksiskās iedarbības veidu un tā atgriezeniskuma aprakstu un gaitu, kā arī autopsijā iegūtos novērojumus.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Pārskats par testu**

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikāli ķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),

— identifikācijas dati, tostarp *CAS* numurs.

Nesējs (ja vajadzīgs):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

▼B

— dzīvnieku mikrobioloģiskais statuss, ja tas zināms,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums (ietverot, ja vajadzīgs, vīrišķā dzimuma īpatņu izmantošanu sievišķā dzimuma īpatņu vietā),

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.

Testa apstākļi:

— informācija par testējamās vielas preparātu, ietverot datus par ievadītā materiāla fizikālo formu,

— sīkas ziņas par testējamās vielas ievadīšanu, iekļaujot ievadāmos tilpumus un ievadīšanas laikus,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (iekļaujot veidu/izcelsmi, ūdens avotu),

— sākotnējās devas izvēles pamatojums.

Rezultāti:

— katra dzīvnieka atbildes reakciju datu tabula un devas līmenis (t. i., dzīvniekiem, kas uzrādījuši toksiskuma pazīmes, tostarp nobeigšanās gadījumus, iedarbības veidu, smagumu un ilgumu),

— datu tabula par ķermeņa svaru un ķermeņa svara izmaiņām,

— katra dzīvnieka svars ievadīšanas dienā un pēc tam ar nedēļas starplaikiem, kā arī nobeigšanās vai nonāvēšanas laikā,

— nobeigšanās datums un laiks, ja tā notikusi pirms paredzētās nonāvēšanas,

— toksiskuma pazīmju parādīšanās gaita katram dzīvniekam, un vai tās ir bijušas atgriezeniskas,

— katra dzīvnieka autopsijā konstatētais un histopatoloģiskās konstatācijas, ja tās pieejamas.

Rezultātu apspriešana un interpretācija.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 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, p. 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, p. 729–734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 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, p. 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,p. 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://webnet1.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, p. 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. PAPILDINĀJUMS

KATRAI SĀKOTNĒJAI DEVAI IEVĒROJAMĀ PROCEDŪRA

VISPĀRĪGAS PIEZĪMES

Attiecībā uz katru sākotnējo devu ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

— 1.a papildinājums – sākotnējā deva 5 mg/kg ķermeņa svara,

— 1.b papildinājums – sākotnējā deva 50 mg/kg ķermeņa svara,

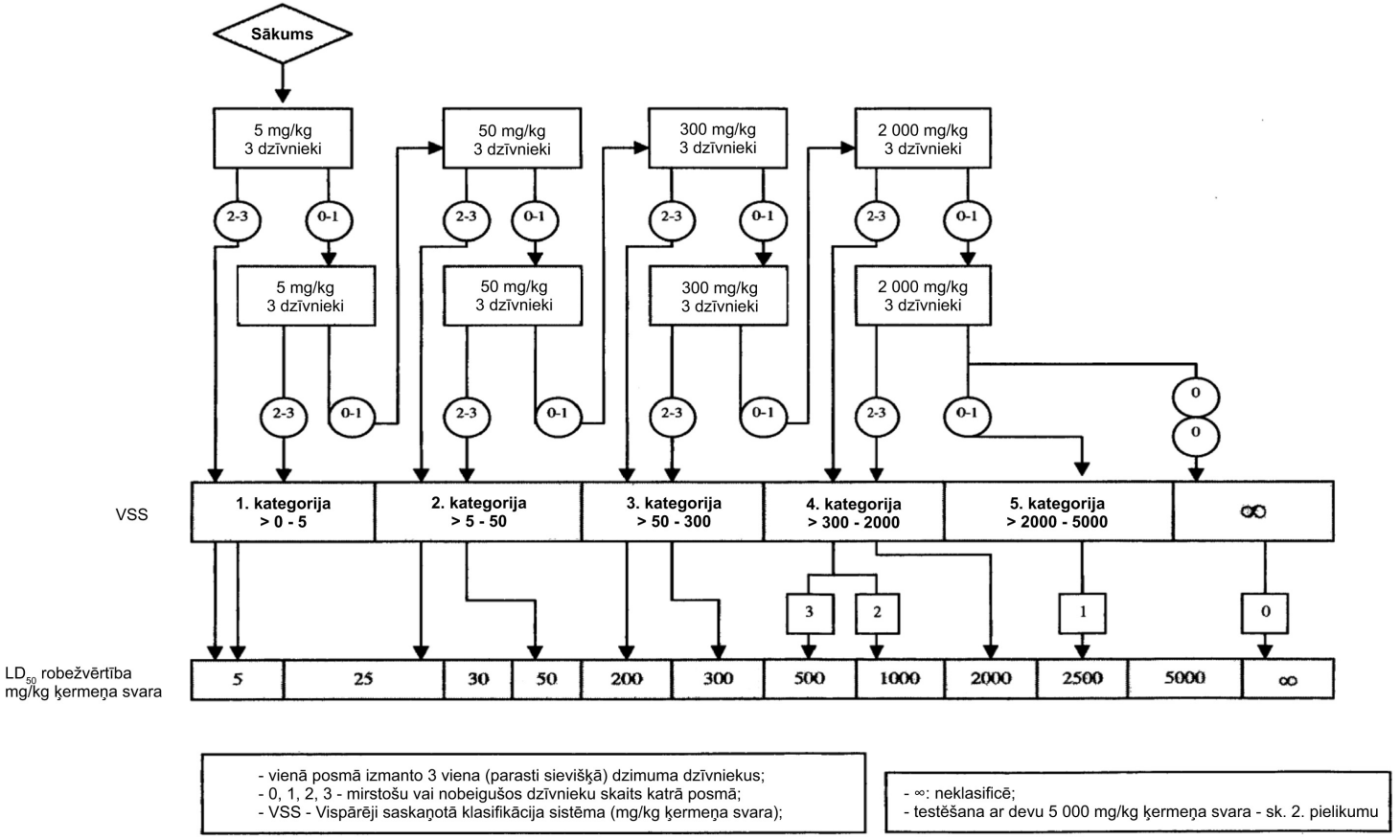
— 1.c papildinājums – sākotnējā deva 300 mg/kg ķermeņa svara,

— 1.d papildinājums – sākotnējā deva 2 000 mg/kg ķermeņa svara.

Humānu apsvērumu dēļ nonāvēto vai bojāgājušo dzīvnieku skaita testēšanas procedūra jāveic, kā norādīts ar bultiņām.

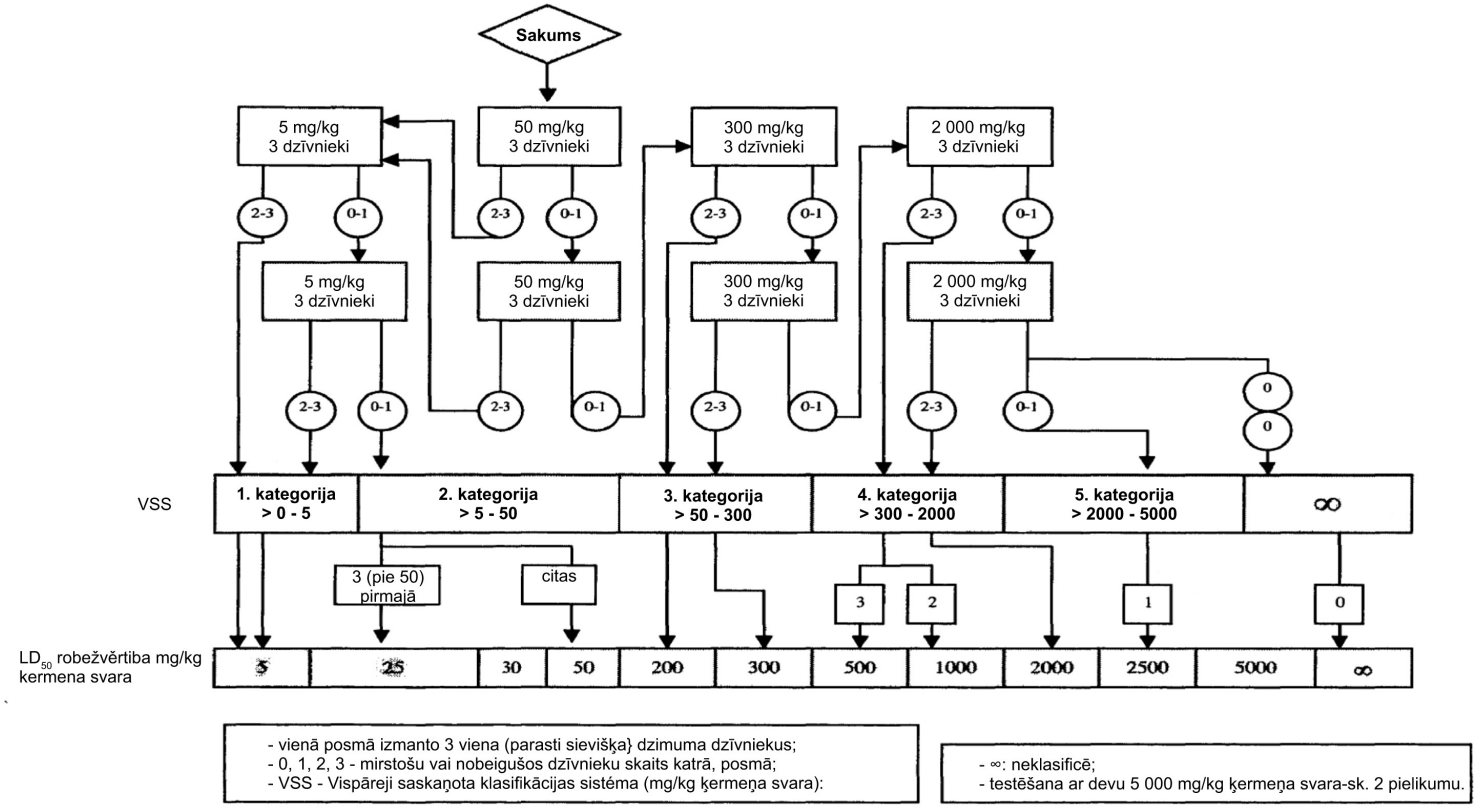
1.A PAPILDINĀJUMS

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA AR SĀKOTNĒJO DEVU 5 MG/KG ĶERMEŅA SVARA



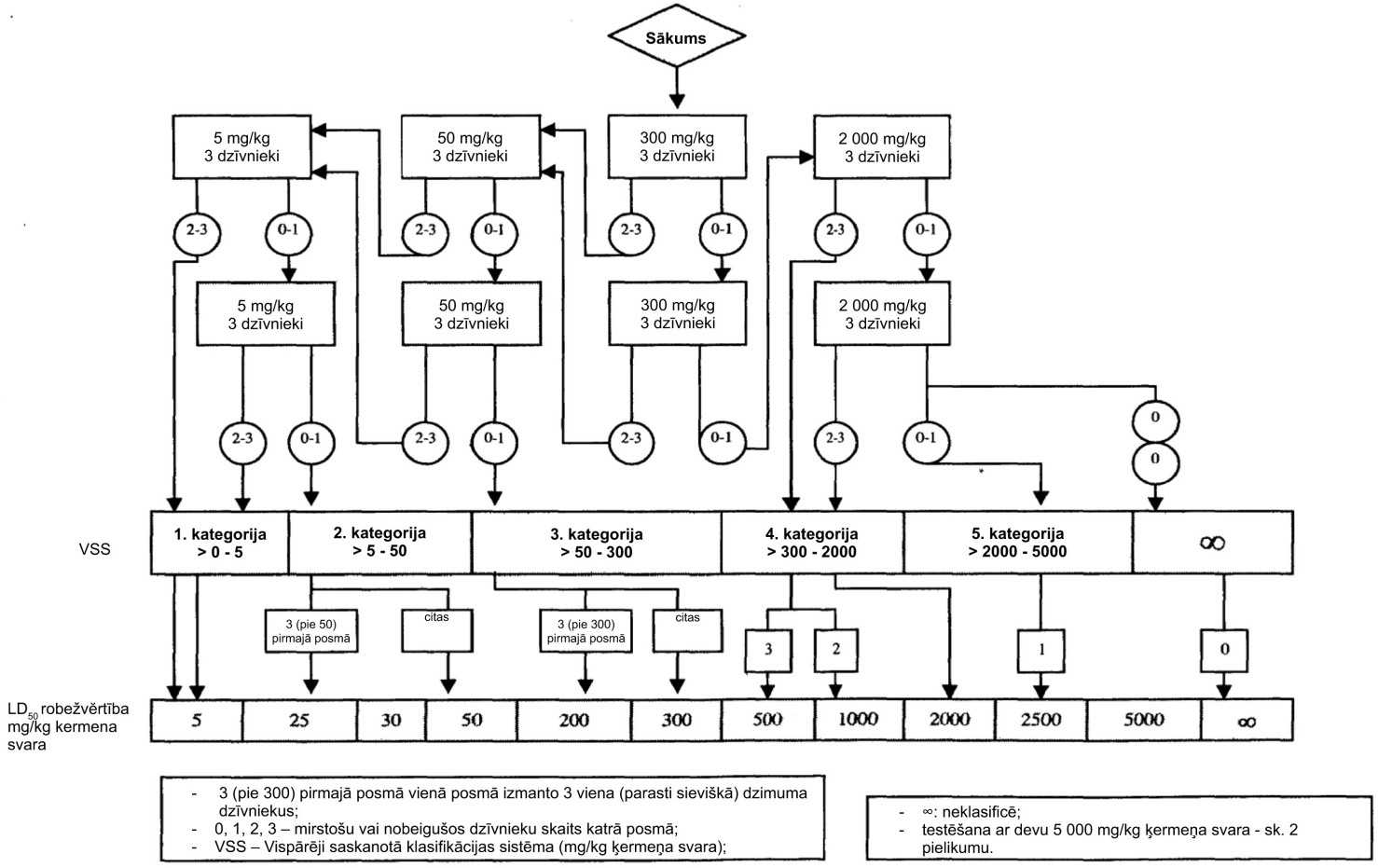
1.B PAPILDINĀJUMS

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA AR SĀKOTNĒJO DEVU 50 MG/KG ĶERMEŅA SVARA



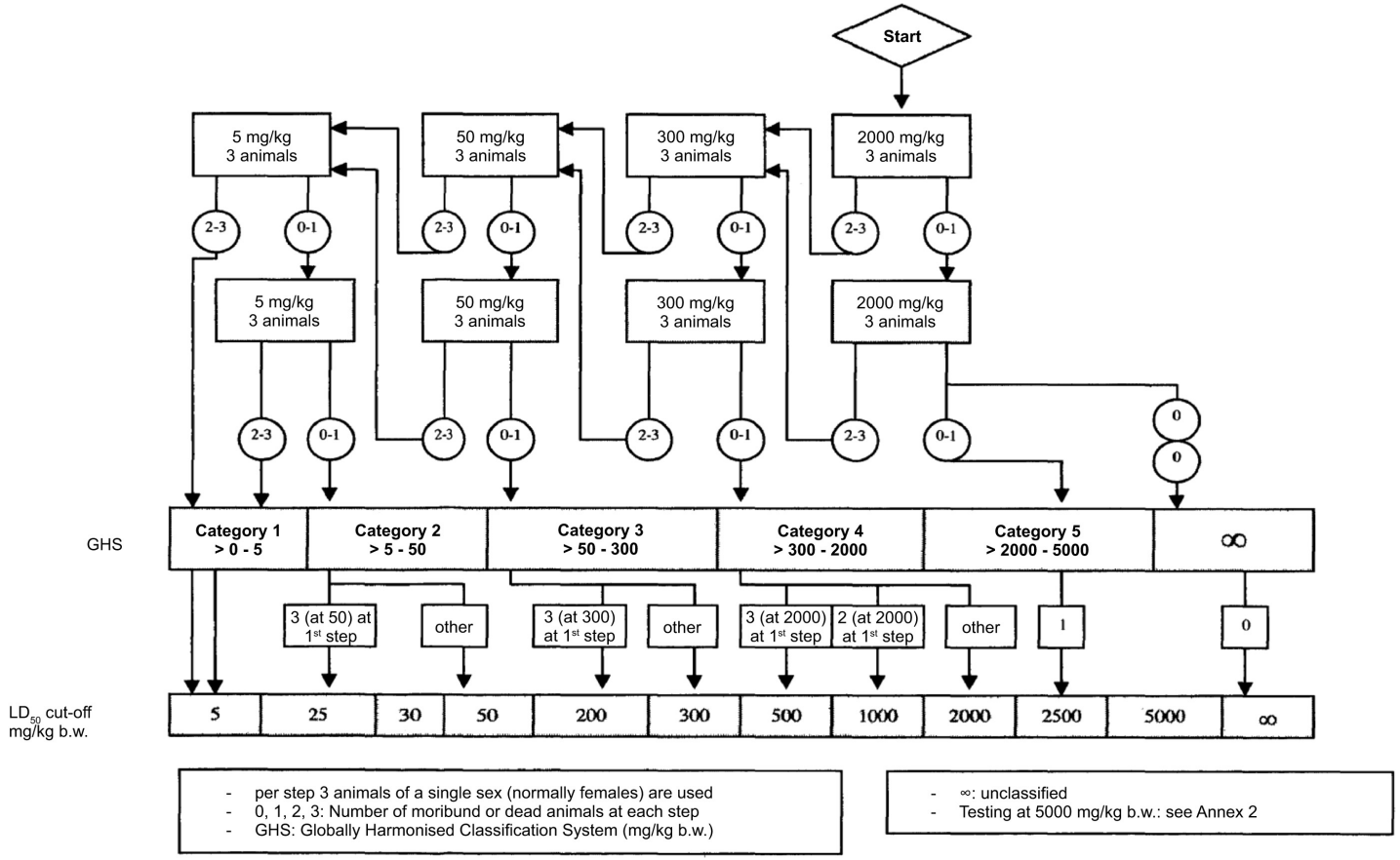
1.C PAPILDINĀJUMS

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA AR SĀKOTNĒJO DEVU 300 MG/KG ĶERMEŅA SVARA



1.D PAPILDINĀJUMS

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA AR SĀKOTNĒJO DEVU 2 000 MG/KG ĶERMEŅA SVARA



▼B

2. PAPILDINĀJUMS

KLASIFIKĀCIJAS KRITĒRIJI TESTĒJAMAJĀM VIELĀM AR PAREDZAMAJĀM LD_{50} VĒRTĪBĀM VIRS 2 000 MG/KG, NEVEICOT TESTUS

Kritēriji, kas noteikti 5. bīstamības kategorijai, ir vērsti uz tādu testējamo vielu identifikāciju, kurām ir gan relatīvi zems akūtais toksiskums, tomēr zināmos apstākļos tās var būt bīstamas jutīgām populācijām. Šo vielu sagaidāmā LD_{50}, ievadot caur muti vai uzsūcoties caur ādu, ir 2 000–5 000 mg/kg vai citiem ievadīšanas veidiem tām līdzvērtīgas. Testējamās vielas var iedalīt šajā bīstamības kategorijā, kas noteikta: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (VSS 5. kategorija) šādos gadījumos:

a) ja šī kategorija noteikta pēc kādas no 1.a–1.d papildinājumā norādītajām testēšanas shēmām, pamatojoties uz mirstības gadījumiem;

b) ja ir ticami dati, kas norāda, ka LD_{50} ir 5. kategorijai noteiktajā vērtību diapazonā, vai pētījumi ar citiem dzīvniekiem vai arī toksiskā iedarbība uz cilvēka organismu ir tāda, ka tai ir akūtas iedarbības raksturs;

c) izmantojot datu ekstrapolāciju, aprēķinu vai mērījumu metodes, ja nav nepieciešams piešķirt augstāku bīstamības kategoriju, un

— ir pieejama ticama informācija, kas liecina par būtisku toksisku iedarbību uz cilvēka organismu, vai

— novēroti bojāejas gadījumi, veicot testus līdz 4. kategorijas vērtībām, ievadot orāli, vai

— ja, veicot testus līdz 4. kategorijas vērtībām, izņemot caureju, piloerekciju vai izskatu, ekspertu slēdziens apstiprina būtiskas klīniskas toksiskuma pazīmes, vai

— ja ekspertu slēdziens apstiprina ticamu citos pētījumos ar dzīvniekiem iegūtu informāciju par būtisku toksisku iedarbību.

TESTĒŠANA AR DEVĀM VIRS 2 000 MG/KG

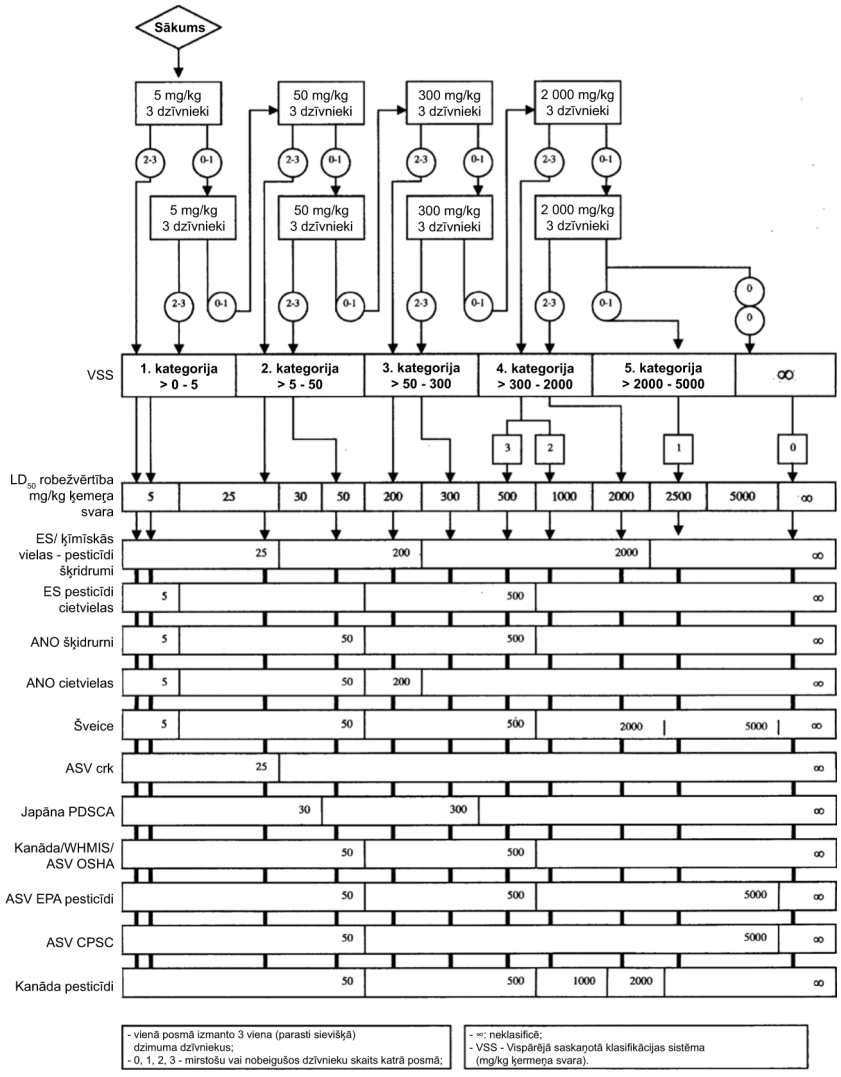
Sakarā ar nepieciešamību ievērot dzīvnieku labturības prasības nav ieteicams veikt testus ar 5. kategorijas devām, kas pārsniedz 5 000 mg/kg, un tie jāveic tikai tādos gadījumos, kad ir ļoti lielas iespējas, ka tie ir tieši saistīti ar dzīvnieku aizsardzību vai cilvēku veselības aizsardzību (10). Nav jāveic papildu testēšana ar augstākām devām.

Ja jāveic testi ar 5 000 mg/kg devu, tas jāveic tikai vienā posmā, t. i., ar trijiem dzīvniekiem. Ja pirmais dzīvnieks, kam šī deva ievadīta, nobeidzas, saskaņā ar diagrammu 1. papildinājumā nākamā ievadāmā deva ir 2 000 mg/kg. Ja pirmais dzīvnieks izdzīvo, devu ievada vēl diviem dzīvniekiem. Ja no trijiem dzīvniekiem nobeidzas tikai viens, paredzams, ka LD_{50} vērtība ir augstāka nekā 5 000 mg/kg. Ja iet bojā abi dzīvnieki, nākamā ievadāmā deva ir 2 000 mg/kg.

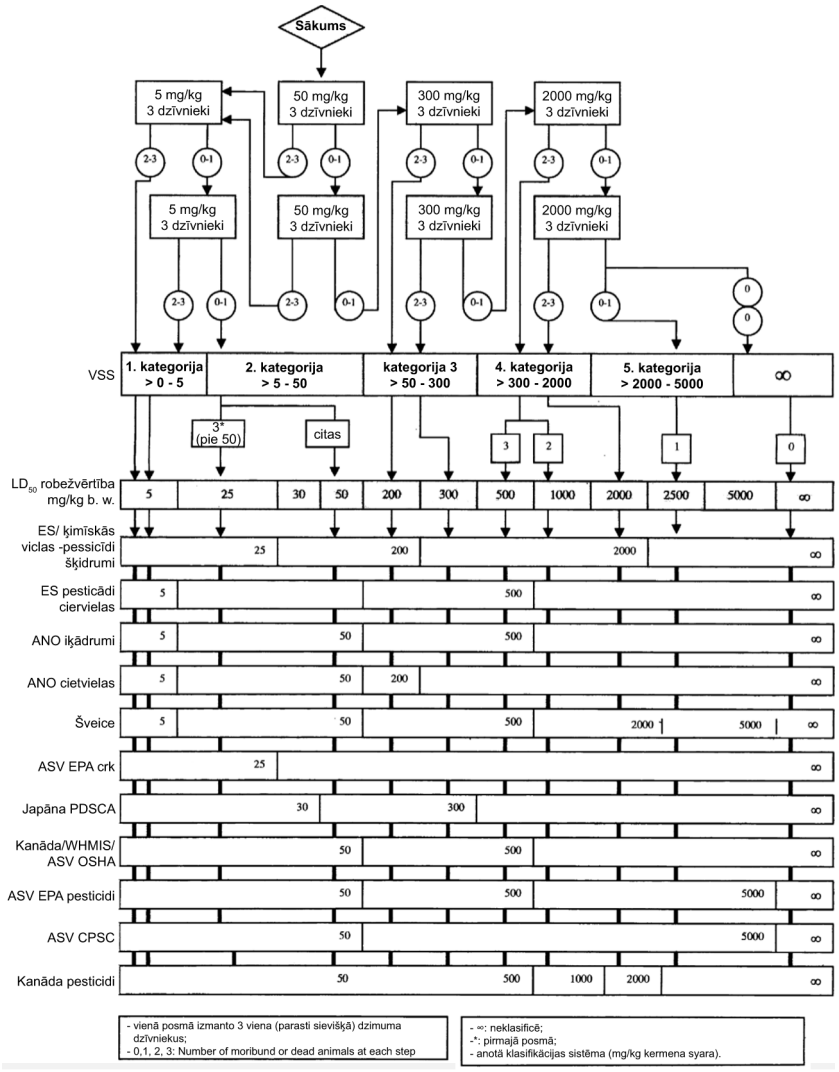
▼B

3. PAPILDINĀJUMS

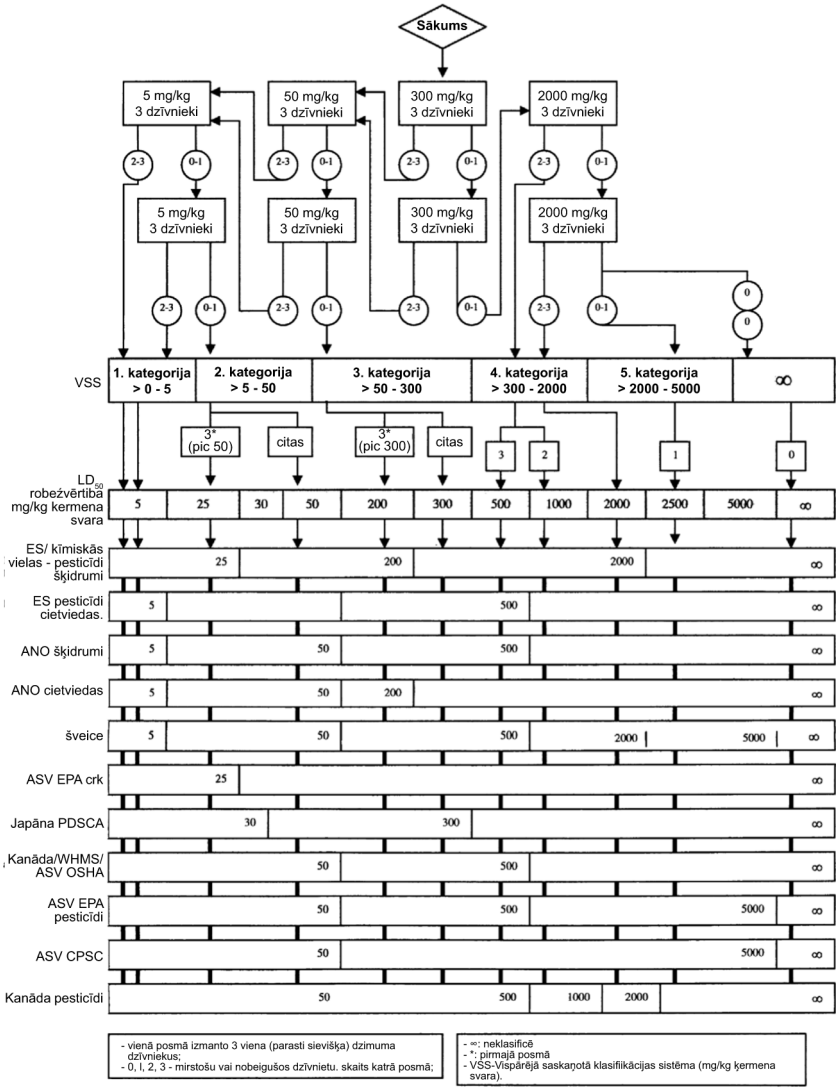
TESTĒŠANAS METODE B.1.b. Nosacījumi par klasifikāciju saskaņā ar ES sistēmu pārejas laikā līdz Vispārējās saskaņotās sistēmas (VSS) pilnīgai ieviešanai (literatūras sarakstā (8))



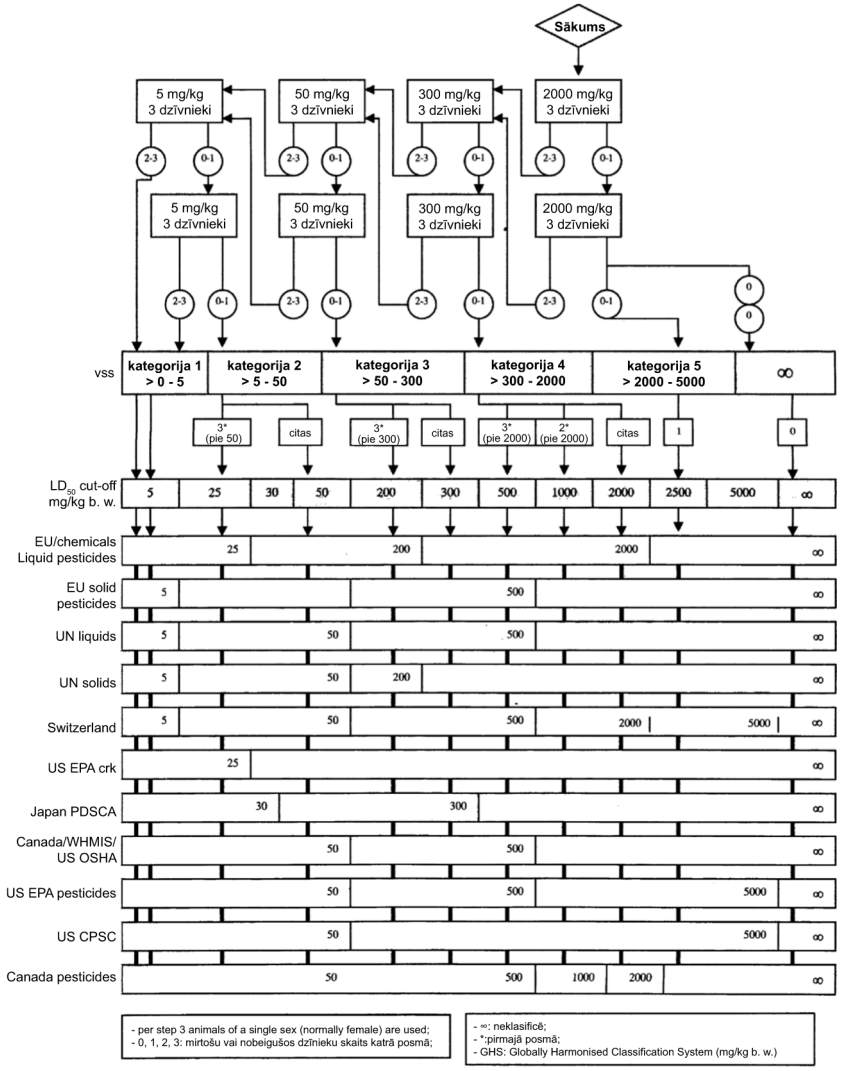
▼B


Sākums
5 mg/kg 3 dzīvnieki
50 mg/kg 3 dzīvnieki
300 mg/kg 3 dzīvnieki
2000 mg/kg 3 dzīvnieki
2-3
0-1
0
VSS
1. kategorija > 0 - 5
2. kategorija > 5 - 50
kategorija 3 > 50 - 300
4. kategorija > 300 - 2000
5. kategorija > 2000 - 5000
∞
3* (pie 50)
citas
LD50 robežvērtība mg/kg b. w.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
ES/ ķimīskās viclas -pessicīdi šķidrumi
ES pesticādi ciervielas
ANO iķādrumi
ANO cietvielas
Šveice
ASV EPA crk
Japāna PDSCA
Kanāda/WHMIS/ ASV OSHA
ASV EPA pesticidi
ASV CPSC
Kanāda pesticidi
- vienā posmā izmanto 3 viena (parasti sievišķā) dzimuma dzīvniekus;
- 0,1, 2, 3: Number of moribund or dead animals at each step
- ∞: neklasificē;
-*: pirmajā posmā;
- anotā klasifikācijas sistēma (mg/kg kermena syara).

▼B


Sākums
5 mg/kg 3 dzīvnieki
50 mg/kg 3 dzīvnieki
300 mg/kg 3 dzīvnieki
2000 mg/kg 3 dzīvnieki
2-3
0-1
0
VSS
1. kategorija > 0 - 5
2. kategorija > 5 - 50
3. kategorija > 50 - 300
4. kategorija > 300 - 2000
5. kategorija > 2000 - 5000
∞
3* (pic 50)
citas
3* (pic 300)
citas
3
2
1
0
LD50 robežvērtība mg/kg ķermena svara
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
ES/ kīmiskās vielas - pesticīdi šķidrumi
ES pesticīdi cietviedas.
ANO šķidrumi
ANO cietviedas
šveice
ASV EPA crk
Japāna PDSCA
Kanāda/WHMS/ ASV OSHA
ASV EPA pesticīdi
ASV CPSC
Kanāda pesticīdi
- vienā posmā izmanto 3 viena (parasti sievišķa) dzimuma dzīvniekus;
- 0, l, 2, 3 - mirstošu vai nobeigušos dzīvnieku. skaits katrā posmā;
- ∞: neklasificē
- *: pirmajā posmā
- VSS-Vispārējā saskaņotā klasifiikācijas sistēma (mg/kg ķermena svara).

▼B


Sākums
5 mg/kg 3 dzīvnieki
50 mg/kg 3 dzīvnieki
300 mg/kg 3 dzīvnieki
2000 mg/kg 3 dzīvnieki
2-3
0-1
0
vss
kategorija 1 > 0 - 5
kategorija 2 > 5 - 50
kategorija 3 > 50 - 300
kategorija 4 > 300 - 2000
kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (pie 50)
citas
3* (pie 300)
3* (pie 2000)
2* (pie 2000)
1
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- per step 3 animals of a single sex (normally female) are used;
- 0, 1, 2, 3: mirtošu vai nobeigušos dzīvnieku skaits katrā posmā;
- ∞: neklasificē;
- *:pirmajā posmā;
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg b. w.)

▼M4

B.2. AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 403 (2009. gads) (1). Akūtajai inhalācijas toksicitātei veltītos Testēšanas norādījumus 403 (*TG 403*) pieņēma 1981. gadā. Šī pārskatītā B.2. testēšanas metode (kā pārskatīto *TG 403* ekvivalents) ir izstrādāta tā, lai tā būtu elastīgāka, samazinātu dzīvnieku izmantošanu un nodrošinātu regulatīvās vajadzības. Pārskatītā testēšanas metode aptver divu veidu pētījumus, proti, tradicionālo LC_{50} protokolu un koncentrācija × laiks ($C \times t$) protokolu. Šīs testēšanas metodes galvenās iezīmes ir iespēja nodrošināt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību diapazonā no neletāliem līdz letāliem iznākumiem, lai uzzinātu vidējo letālo koncentrāciju (LC_{50}), neletālo sliekšņa koncentrāciju (piemēram, LC_{01}) un sakarības slīpumu un noteiktu iespējamu uzņēmības atkarību no dzimuma. $C \times t$ protokols ir jāizmanto gadījumos, kad pastāv konkrēta regulatīva vai zinātniska vajadzība, kuras dēļ ir nepieciešami testi ar dzīvniekiem ar vairākiem ilgumiem, piemēram, plānošanai attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās (piemēram, akūtas ekspozīcijas norāžu līmeņu (*AEGL*) iegūšana, norādījumi plānošanai attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās (*ERPG*) vai akūtas ekspozīcijas robežlīmeņu (*AETL*) vērtības) vai zemes izmantošanas plānošanai.

2. Norādījumi par šīs testēšanas metodes pētījumu veikšanu un interpretēšanu ir pieejami *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (*GD 39*) (2).

3. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un *GD 39* (2).

4. Šī testēšanas metode ļauj raksturot testējamās ķīmiskās vielas un kvantitatīvi novērtēt risku, kā arī ļauj novērtēt un klasificēt testējamās ķīmiskās vielas saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008 (3). *GD 39* (2) ir sniegti norādījumi, kā izvēlēties attiecīgu testēšanas metodi akūtās toksicitātes testēšanai. Ja ir vajadzīga vienīgi informācija par klasifikāciju un marķējumiem, parasti ieteicams izmantot šā pielikuma B.52. nodaļu (4) (sk. *GD 39* (2)). Šī B.2. testēšanas metode nav īpaši paredzēta specializētu materiālu, piemēram, mazšķīstošu izometrisku materiālu vai šķiedrmateriālu, vai rūpnieciski ražotu nanomateriālu, testēšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu testos, testēšanas laboratorijai, pirms tā apsver, vai testēšanu neveikt saskaņā ar šo metodi, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu, arī līdzšinējie pētījumi (piemēram, šā pielikuma B.52. nodaļa (4)), kuru dati palīdzētu izvairīties no papildu testēšanas. Informācija, kas varētu palīdzēt piemērotāko sugu, līniju, dzimuma, ekspozīcijas režīma un attiecīgu testa koncentrāciju izvēlē, ietver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un cilvēka ekspozīcijas iespējamību; pieejamos *(Q)SAR* datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām (sk. *GD 39* (2)).

▼M4

6. Ciktāl iespējams, ir jāizvairās no testiem ar kodīgām un/vai kairinošām testējamām ķīmiskām vielām koncentrācijās, kas, visticamāk, radīs stipras sāpes un/vai ciešanas. Kodīguma/kairinājuma potenciāls ir jānovērtē ekspertiem, izmantojot tādas liecības kā pieredze ar cilvēkiem un dzīvniekiem (piemēram, no atkārtotas devas pētījumiem, kas veikti ar nekodīgām/nekairinošām koncentrācijām), esošie *in vitro* dati (piemēram, no šā pielikuma B.40. nodaļas (5), B.40.a nodaļas (6) vai ESAO *TG 435* (7)), pH vērtības, informācija par līdzīgām vielām vai jebkādi citi derīgi dati, lai noskaidrotu, vai varētu neveikt turpmākus testus. Tā kā šī testēšanas metode pētījuma vadītājam vai galvenajam pētniekam nodrošina mērķkoncentrāciju izvēles kontrolēšanas iespēju, šo metodi var izmantot, lai pakļautu dzīvniekus šādu materiālu iedarbībai sakarā ar konkrētām regulatīvām vajadzībām (piemēram, ārkārtas situāciju plānošanai). Tomēr mērķkoncentrācijā nedrīkst būt smaga kairinoša/kodīga iedarbība, lai gan tai jābūt pietiekamai, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līkne pagarinātos līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, kā arī jāsniedz koncentrāciju izvēles pamatojums (sk. *GD 39* (2)).

TESTA PRINCIPS

7. Šī pārskatītā B.2. testēšanas metode ir paredzēta tam, lai attiecībā uz vienu vai abiem dzimumiem, kā nepieciešams kvantitatīvajos riska novērtējumos, iegūtu testējamās ķīmiskās vielas klasificēšanai pietiekamu informāciju par tās akūto toksicitāti, kā arī datus par mirstību (piemēram, $LC_{50,}$ LC_{01} un slīpums). Šis testēšanas metožu apraksts piedāvā divas metodes. Pirmā metode ir tradicionālais protokols, kurā dzīvnieku grupas tiek pakļautas robežkoncentrācijai (pieļaujamā daudzuma tests) vai koncentrāciju sērijai vairākpakāpju procedūrā uz iepriekš noteiktu ilgumu, kas parasti ir četras stundas. Konkrētām regulatīvām vajadzībām var izmantot citus ekspozīcijas ilgumus. Otrā metode ir ($C \times t$) protokols, kurā dzīvnieku grupas tiek pakļautas vienai koncentrācijai (robežkoncentrācijai) vai vairāku koncentrāciju sērijai vairākos periodos.

8. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testa rezultātus, tie jāuzlūko tāpat kā testā nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (8).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

9. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

10. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ekspozīcijas dienā dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem (8–12 nedēļas veciem) dzīvniekiem ar ķermeņa svaru, kas nepārsniedz ± 20 % no jebkādu iedarbībai iepriekš pakļautu tāda paša vecuma abu dzimumu dzīvnieku vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas nejaušināti un marķē individuālai identificēšanai. Dzīvniekus līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos. Dzīvnieki īsu laiku pirms testa sākšanas ir jāaklimatizē arī attiecībā uz testa aprīkojumu, jo tas samazinās jaunās vides radīto stresu.

▼M4

Dzīvnieku turēšana

11. Temperatūrai testa dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieka deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai imobilizācijas risku. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā.

Inhalācijas kameras

12. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības un testa mērķis. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmienu principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti *GD 39* (2).

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

13. Deguna ekspozīcija žurkām var ilgt līdz sešām stundām. Ja deguna ekspozīciju veic pelēm, ekspozīcijām parasti nevajadzētu ilgt vairāk par četrām stundām. Ja ir vajadzīgi ilgāki pētījumi, tas jāpamato (sk. *GD 39* (2)). Dzīvnieki, kas aerosola iedarbībai tiek pakļauti visa ķermeņa kamerās, ir jātur atsevišķi, lai nepieļautu, ka citi būra dzīvnieki testējamo ķīmisko vielu uzņem, laizot eksponētos dzīvniekus. Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.

14. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāuzmanās, lai izvairītos no sprādzienbīstamu koncentrāciju ģenerēšanas.

▼M4

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

15. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (*MMAD*) diapazonā no 1 līdz 4 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (2) (9) (10). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas, šķiedrmateriāli un higroskopiski materiāli (kas elpošanas sistēmas mitrajā vidē izplešas) šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

16. Lai ģenerētu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu atmosfērā, var izmantot nesējvielu. Ieteicamā nesējviela visos gadījumos noteikti ir ūdens. Lai panāktu vajadzīgo daļiņu sadalījumu pēc lieluma, daļiņu materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem, tomēr jānodrošina, lai testējamā ķīmiskā viela nesadalītos un nepārmainītos. Gadījumos, kad uzskata, ka mehāniski procesi ir mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu (pārāk augstās temperatūrās, ko pārāk intensīvā malšanā radījusi berze), testējamās ķīmiskās vielas sastāvs ir analītiski jāpārbauda. Jāievēro attiecīga piesardzība, lai testējamo ķīmisko vielu nepiesārņotu. Nav nepieciešams testēt nedrūpošus graudveida materiālus, kas ir izstrādāti tā, lai būtu neieelpojami. Jāveic berzes tests, lai pierādītu, ka, graudveida materiālus apstrādājot, nerodas ieelpojamas daļiņas. Ja berzes testā tiek iegūtas ieelpojamas daļiņas, jāveic inhalācijas toksicitātes tests.

Kontroldzīvnieki

17. Līdztekus veiktas negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav vajadzīga. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto nesējvielu, kas nav ūdens, nesējvielas kontroles grupa jāizmanto tikai tad, ja nav pieejami vēsturiski inhalācijas toksicitātes dati. Ja nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes pētījums toksicitāti neatklāj, secina, ka nesējviela pārbaudītajā koncentrācijā nav toksiska; tādējādi nesējvielas kontroles grupa nav nepieciešama.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS

Gaisa plūsma caur kameru

18. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai stabilitātes) monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos atmosfēras ģenerēšanas parametrus. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana gadījumos, kur gaisa plūsma ekspozīcijas sistēmā nav pietiekama, lai nodrošinātu testējamās ķīmiskās vielas atmosfēras dinamisku plūsmu. Ir pieejamas metodikas, ko var izmantot, lai pierādītu, ka konkrētos darbības apstākļos atkārtota ieelpošana nenotiek (2) (11). Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šiem standartiem, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra.

▼M4

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

19. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir jāmonitorē un jāreģistrē vismaz trīs reizes, ja tests ilgst līdz četrām stundām, un reizi stundā, ja tas ir īsāks. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

20. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko dala ar kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

21. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu) vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam ir tāds pats sastāvs kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka visas fāzes tika ievāktas ar izraudzīto metodi. Mērķkoncentrācija, nominālā un faktiskā koncentrācija ir jānorāda pētījuma ziņojumā, bet statistiskajā analīzē, kurā aprēķina letālo koncentrāciju vērtības, izmanto vienīgi faktiskās koncentrācijas.

22. Ja iespējams, jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jābūt noteiktām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī tās tīrībai un, ja tehniski iespējams, identitātei, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumam. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.).

23. Ekspozīcijas atmosfēru uztur iespējami nemainīgu un nepārtraukti un/vai periodiski monitorē atkarībā no analīzes metodes. Ja paraugus ņem periodiski, četru stundu pētījuma laikā kameras atmosfēras paraugi ir jāņem vismaz divas reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, visā ekspozīcijas periodā var paņemt vienu paraugu. Ja tiek konstatētas ievērojamas svārstības starp paraugiem, nākamo

▼M4

koncentrāciju testēšanā katras ekspozīcijas laikā jāņem četri paraugi. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem no vidējās koncentrācijas nevajadzētu atšķirties vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem vai vairāk kā par ± 20 % šķidriem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst visam laikam, kad testējamā ķīmiskā viela tiek ģenerēta, ieskaitot laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu t_{95}. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti *GD 39* (2).

24. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi, tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda maisījumam, nevis tikai aktīvajai vielai vai komponentam (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama *GD 39* (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

25. Katras četru stundu ekspozīcijas laikā aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz divas reizes, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju. Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsitējs/gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. *GD 39* (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecinošu datu ieguvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot ekspozīciju. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību (sk. 15. punktu).

PROCEDŪRA

26. Turpmāk ir aprakstīti divu veidu pētījumi, proti, tradicionālais protokols un $C \times t$ protokols. Abos protokolos var ietilpt devu diapazona pētījums, galvenais pētījums un/vai pieļaujamā daudzuma tests (tradicionālais protokols) vai testēšana ar robežkoncentrāciju ($C \times t$). Ja ir zināms, ka viens no dzimumiem ir uzņēmīgāks, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt šos pētījumus tikai ar uzņēmīgo dzimumu. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Lai dzīvnieku izmantošanu samazinātu līdz minimumam, pirms testa sākšanas jāizskata visi pieejamie dati. Piemēram, dati, kas iegūti, izmantojot šā pielikuma B.52. nodaļu (4), var nozīmēt, ka nav vajadzīgs devu diapazona pētījums, kā arī var parādīt, vai kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks (sk. *GD 39* (2)).

▼M4

TRADICIONĀLAIS PROTOKOLS

Vispārīgi apsvērumi: tradicionālais protokols

27. Tradicionālajā pētījumā dzīvnieku grupas iepriekš noteiktu laiku (parasti četras stundas) tiek pakļautas testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai vai nu deguna ekspozīcijas, vai visa ķermeņa ekspozīcijas kamerā. Dzīvnieki tiek pakļauti vai nu robežkoncentrācijai (pieļaujamā daudzuma tests), vai vismaz trijām koncentrācijām vairākpakāpju procedūrā (galvenais pētījums). Pirms galvenā pētījuma var veikt devu diapazona pētījumu, ja vien kaut kāda apjoma informācija par testējamo ķīmisko vielu, piemēram, iepriekš veikts B.52. nodaļas pētījums (sk. *GD 39* (2)), nav jau pieejama.

Devu diapazona pētījums: tradicionālais protokols

28. Devu diapazona pētījumu izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas iedarbīgumu, konstatētu uzņēmīguma atšķirības starp dzimumiem un palīdzētu izvēlēties ekspozīcijas koncentrācijas līmeņus galvenajam pētījumam vai pieļaujamā daudzuma testam. Izvēloties koncentrācijas līmeņus devu diapazona pētījumam, jāizmanto visa pieejamā informācija, arī pieejamie *(Q)SAR* dati un dati par līdzīgām ķīmiskām vielām. Katras koncentrācijas iedarbībai nevajadzētu pakļaut vairāk kā trīs tēviņus un trīs mātītes (lai noteiktu atšķirības starp dzimumiem, var būt vajadzīgi tris dzīvnieki no katra dzimuma). Devu diapazona pētījumā var izmantot vienu koncentrāciju, bet vajadzības gadījumā var testēt vairākas koncentrācijas. Devu diapazona pētījumā nevajag testēt tik daudz dzīvnieku un koncentrāciju, it kā tas būtu galvenais pētījums. Devu diapazona pētījuma vietā var izmantot iepriekš veiktu B.52. nodaļas pētījumu (4) (sk. *GD 39* (2)).

Pieļaujamā daudzuma tests: tradicionālais protokols

29. Pieļaujamā daudzuma testu izmanto gadījumos, kad par testējamo ķīmisko vielu ir zināms vai sagaidāms, ka tā faktiski būs netoksiska, t. i., tā izraisīs toksisku atbildes reakciju tikai tad, ja koncentrācija pārsniegs regulatīvo robežkoncentrāciju. Pieļaujamā daudzuma testā testējamās ķīmiskās vielas robežkoncentrācijas iedarbībai pakļauj vienu grupu, kurā ir trīs tēviņi un trīs mātītes. Informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu var iegūt no zināšanām par līdzīgām pārbaudītām ķīmiskām vielām, ņemot vērā to sastāvdaļu identitāti un procentuālo saturu, par kurām ir zināms, ka tās ir toksikoloģiski būtiskas. Situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī ir paredzams, ka testējamā ķīmiskā viela būs toksiska, ir jāveic galvenais tests.

30. Robežkoncentrāciju izvēle parasti ir atkarīga no regulatīvajām prasībām. Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l (vai maksimālā sasniedzamā koncentrācija) (3). Tehniski var būt grūti ģenerēt dažu testējamo ķīmisko vielu, it sevišķi tvaiku un aerosolu, robežkoncentrācijas. Testējot aerosolus, galvenajam mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (1–4 μm *MMAD*). Ar lielāko daļu testējamo ķīmisko vielu tas ir iespējams koncentrācijā 2 mg/l. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. *GD 39* (2)). Regulā (EK) Nr. 1272/2008 dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ iesaka izvairīties no testiem ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas (3). Vai neveikt testēšanu ar robežkoncentrāciju, būtu jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šāda testa rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībai (3), un pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmantotu dzīvniekus, pirms pieļaujamā daudzuma testa ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka pieļaujamā daudzuma testa kameras apstākļi ir sasniedzami.

▼M4

31. Ja ar robežkoncentrāciju tiek novērota mirstība (nāve un/vai pirmsnāves stāvoklis), pieļaujamā daudzuma testa rezultātus var izmantot par devu diapazona pētījumu turpmākai testēšanai ar citām koncentrācijām (sk. galveno pētījumu). Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālās vai ķīmiskās īpašības neļauj sasniegt robežkoncentrāciju, tests jāveic ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju. Ja ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju nesasniedz 50 %, turpmāka testēšana nav vajadzīga. Ja robežkoncentrāciju sasniegt nav bijis iespējams, pētījuma ziņojumā jāsniedz paskaidrojums un pamatojoši dati. Ja maksimālā sasniedzamā tvaika koncentrācija nerada toksisku reakciju, var būt vajadzīgs ģenerēt testējamo ķīmisko vielu kā šķidru aerosolu.

Galvenais pētījums: tradicionālais protokols

32. Galveno pētījumu parasti veic, izmantojot piecus tēviņus un piecas mātītes (vai piecus uzņēmīgā dzimuma dzīvniekus, ja tas ir zināms) katram koncentrācijas līmenim un vismaz trīs koncentrācijas līmeņus. Jāizmanto pietiekami koncentrācijas līmeņi, lai iegūtu drošu statistisku analīzi. Laika intervāls starp ekspozīcijas grupām ir atkarīgs no toksicitātes pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvnieki jāpakļauj tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdzīvojušajiem dzīvniekiem. Tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju nākamajai ekspozīcijas grupai. Tā kā inhalācijas pētījumos tiek izmantotas sarežģītas tehnoloģijas, tas ne vienmēr būs iespējams, tāpēc dzīvnieku pakļaušana nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai jāpamato uz iepriekšējo pieredzi un zinātnisku loģiku. Testējot maisījumus, jāņem vērā *GD 39* (2).

KONCENTRĀCIJA × LAIKS ($C \times t$) PROTOKOLS

Vispārīgi apsvērumi: *C* × *t* protokols

33. Inhalācijas toksicitātes vērtēšanā par tradicionālā protokola alternatīvu var uzskatīt $C \times t$ vairākpakāpju pētījumu (12) (13) (14). Šī pieeja ļauj dzīvniekus pakļaut testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai vairākos koncentrācijas līmeņos un ar vairākiem ilgumiem. Testus veic tikai deguna ekspozīcijas kamerā (visa ķermeņa ekspozīcijas kameras šim protokolam praktiski nav izmantojamas). Plūsmas diagramma 1. papildinājumā attēlo šo protokolu. Simulācijas analīze ir parādījusi, ka gan tradicionālais protokols, gan $C \times t$ protokols var nodrošināt uzticamas LC_{50} vērtības, bet $C \times t$ protokols parasti labāk spēj nodrošināt uzticamas LC_{01} un LC_{10} vērtības (15).

34. Simulācijas analīze ir parādījusi, ka divu dzīvnieku izmantošana katrā $C \times t$ intervālā (viens no katra dzimuma, ja izmanto abus dzimumus, vai divi no uzņēmīgākā dzimuma) parasti ir pietiekams skaits galvenajā pētījumā, kurā testē četrus koncentrācijas un piecus ekspozīcijas ilgumus. Dažos gadījumos pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot divas žurkas no katra dzimuma katrā $C \times t$ intervālā (15). Uz katru koncentrācijas un laika kombināciju izmantojot divus dzīvniekus no katra dzimuma, var mazināt aplēses sistemātisko kļūdu un izkliedi, palielināt aplēses sekmīguma koeficientu un uzlabot ticamības intervāla segumu. Tomēr, ja pietiekami līdzīgi dati nav pieejami, noteikšanai (kurā izmanto vienu dzīvnieku no katra dzimuma vai divus no uzņēmīgākā dzimuma) var pietikt ar piekto ekspozīcijas koncentrāciju. Turpmāki norādījumi par $C \times t$ pētījumā izmantojamo dzīvnieku un koncentrāciju skaitu ir pieejamas *GD 39* (2).

▼M4

Devu diapazona pētījums: *C* × *t* protokols

35. Devu diapazona pētījumu izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas iedarbīgumu un lai labāk izraudzītos ekspozīcijas koncentrācijas līmeņus galvenajam pētījumam. Lai izvēlētos attiecīgu sākumkoncentrāciju galvenajam pētījumam un iespējami samazinātu izmantoto dzīvnieku skaitu, var būt vajadzīgs devu diapazona pētījums, izmantojot līdz trijiem dzīvniekiem/-dzimumiem/koncentrācijām (sīkāka informācija pieejama *GD 39* III papildinājumā (2)). Lai noteiktu atšķirības starp dzimumiem, var būt nepieciešams izmantot trīs dzīvniekus no katra dzimuma. Šie dzīvnieki ir jāpakļauj iedarbībai vienu ilgumu, parasti 240 minūtes. Tas, vai ir iespējams ģenerēt vajadzīgās testa atmosfēras, jānovērtē pirmstesta tehniskās testēšanas laikā bez dzīvniekiem. Ja mirstības dati ir pieejami no B.52. nodaļas pētījuma (4), devu diapazona pētījumu parasti nav vajadzīgs veikt. B.2. nodaļas pētījumā izvēloties sākotnējo mērķkoncentrāciju, pētījuma vadītājam ir jāņem vērā mirstības ainas, kas attiecībā uz abiem dzimumiem un visām testa koncentrācijām novērotas jebkādos pieejamos B.52. nodaļas pētījumos (4) (sk. *GD* 39 (2)).

Sākotnējā koncentrācija: *C* × *t* protokols

36. Sākotnējā koncentrācija (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums) būs vai nu robežkoncentrācija, vai koncentrācija, ko izvēlējies pētījuma vadītājs, pamatojoties uz devu diapazona pētījumu. Grupas, kurā ir pa dzīvniekam no katra dzimuma, šīs koncentrācijas iedarbībai tiek pakļautas vairākus ilgumus (piemēram, 15, 30, 60, 120 vai 240 minūtes), tādējādi kopā izmantojot 10 dzīvniekus (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums).

37. Robežkoncentrāciju izvēle parasti ir atkarīga no regulatīvajām prasībām. Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l (vai maksimālā sasniedzamā koncentrācija) (3). Dažu testējamo ķīmisko vielu, it sevišķi tvaiku un aerosolu, robežkoncentrācijas var būt tehniski grūti ģenerēt. Testējot aerosolus, mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (t. i., 1–4 μm *MMAD*) ar robežkoncentrāciju 2 mg/l. Ar lielāko daļu ķīmisko vielu tas ir iespējams. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. *GD 39* (2)). Regulā (EK) Nr. 1272/2008 dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ iesaka izvairīties no testiem ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas (3). Vai neveikt testus ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas, ir jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šāda testa rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībai (3), un pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmantotu dzīvniekus, pirms testa ar sākotnējo koncentrāciju ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka šādai koncentrācijai atbilstošie kameras apstākļi ir sasniedzami.

38. Ja ar sākotnējo koncentrāciju tiek novērota mirstība vai agonijas stāvoklis, rezultātus ar šo koncentrāciju var izmantot par devu sākumpunktu turpmākai testēšanai ar citām koncentrācijām (sk. galveno pētījumu). Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālās vai ķīmiskās īpašības neļauj sasniegt robežkoncentrāciju, tests jāveic ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju. Ja ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju mirstība nesasniedz 50 %, turpmāka testēšana nav vajadzīga. Ja robežkoncentrāciju sasniegt nav bijis iespējams, pētījuma ziņojumā jāsniedz paskaidrojums un pamatojoši dati. Ja maksimālā sasniedzamā tvaika koncentrācija nerada toksisku reakciju, var būt vajadzīgs ģenerēt testējamo ķīmisko vielu kā šķidru aerosolu.

▼M4

Galvenais pētījums: *C* × *t* protokols

39. Galvenajā pētījumā testētā sākotnējā koncentrācija (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums) būs vai nu robežkoncentrācija, vai koncentrācija, ko izvēlējies pētījuma vadītājs, pamatojoties uz devu diapazona pētījumu. Ja I ekspozīcijas seansa laikā vai pēc tās ir novērota mirstība, minimālā ekspozīcija (*C* × *t*), kas izraisa mirstību, tiks uzskatīta par orientieri, pēc kura noteikt II ekspozīcijas seansa koncentrāciju un ekspozīcijas periodus. Katrs nākamais ekspozīcijas seanss būs atkarīgs no iepriekšējā seansa (sk. 1. papildinājumu).

40. Lai noteiktu *C* × *t* sakarību ar mirstību, daudzām testējamām ķīmiskajām vielām pietiks ar rezultātiem, kas iegūti ar sākotnējo koncentrāciju un papildus vēl trijos ekspozīcijas seansos ar smalkāku ilguma režģi (t. i., ekspozīcijas ilgumu ģeometriskais solis, ko raksturo ar koeficientu starp secīgiem ilgumiem (parasti √2)) (15), bet dažus ieguvumus var dot piektās ekspozīcijas koncentrācijas izmantošana (sk. 1. papildinājumu un *GD 39* (2)). Par *C* × *t* rezultātu matemātisko apstrādi sk. 1. papildinājumu.

NOVĒROJUMI

41. Ekspozīcijas perioda laikā dzīvnieki ir regulāri klīniski jānovēro. Pēc ekspozīcijas klīniskie novērojumi ekspozīcijas dienā jāveic vismaz divreiz vai biežāk, ja to indicē dzīvnieku reakcija uz vielas saņemšanu, un vismaz reizi dienā nākamās 14 dienas. Novērošanas perioda ilgums nav noteikts, bet tas ir jānosaka atkarībā no vērojamām klīniskajām pazīmēm, no to iestāšanās laika un no atveseļošanās perioda ilguma. Ir svarīgi, kādos laikos parādās un izzūd toksicitātes pazīmes, it sevišķi, ja to izpausmei ir tendence aizkavēties. Visus novērojumus regulāri reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kam vērojamas lielu sāpju un/vai ilgstošu ciešanu pazīmes, dzīvnieku labturības nolūkos ir humāni jānonāvē. Veicot pārbaudes, lai pamanītu klīniskas toksicitātes pazīmes, ir jāuzmanās, lai sākotnējs savārgums un tādas pārejošas pārmaiņas elpošanā, kuru izraisījusi ekspozīcijas procedūra, netiktu kļūdaini uzskatītas par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, sakarā ar ko būtu vajadzīga dzīvnieku priekšlaicīga nonāvēšana. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Guidance Document on Humane Endpoints* (*GD 19*) (7). Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

42. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites, veģetatīvās un centrālās nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakcijas pārmaiņām. Ja iespējams, uzmanība jāpievērš jebkādām atšķirībām starp lokālo un sistēmisko ietekmi. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu.

Ķermeņa svars

43. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē vienu reizi aklimatizēšanās periodā, ekspozīcijas dienā pirms ekspozīcijas (0. diena) un vismaz pirmajā, trešajā un septītajā dienā (un reizi nedēļā pēc tam), kā arī nāves vai eitanāzijas brīdī, ja tas notiek pēc pirmās dienas. Ķermeņa svaru uzskata par ļoti svarīgu toksicitātes pazīmi, tādēļ dzīvnieki, kam vērojams noturīgs ≥ 20 % dekrements salīdzinājumā ar vērtībām, kuras iegūtas priekšizpētē, ir cieši jāmonitorē. Izdzīvojušos dzīvniekus nosver un humāni nonāvē pēcekspozīcijas perioda beigās.

▼M4

Patoloģija

44. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kam dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izdarīta eitanāzija un tie izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna autopsija. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsijas jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Par katru dzīvnieku ir jāreģistrē visas smagās patoloģiskās pārmaiņas, īpašu uzmanību pievēršot jebkādām pārmaiņām elpošanas sistēmā.

45. Lai paplašinātu pētījuma interpretējošo vērtību, var apsvērt, vai apriori neparedzēt papildu pārbaudes, piemēram, izdzīvojušo žurku plaušu svara noteikšanu un/vai tādas liecības par kairinājumu, ko gūst elpošanas sistēmas mikroskopiskā izmeklēšanā. Tāpat var izmeklēt tādus orgānus, kas liecina par smagām patoloģiskām pārmaiņām dzīvniekos, kuri izdzīvojuši 24 vai vairāk stundas, un orgānus, par ko ir zināms vai gaidāms, ka tie tiks skarti. Visas elpošanas sistēmas mikroskopiska izmeklēšana var nodrošināt lietderīgu informāciju par testējamām ķīmiskajām vielām, kas reaģē ar ūdeni, piemēram, skābēm un higroskopiskām testējamām ķīmiskām vielām.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

46. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka svaru un autopsijas atradi. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kas izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi.

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

— apraksts par turēšanu būros, arī par dzīvnieku skaitu (vai skaita maiņām) katrā būrī, pakaišiem, temperatūru un relatīvo mitrumu, apgaismojuma ilgumu un uzturu,

— izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— nejaušības principa izvēles metode,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),

— jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

▼M4

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),

— identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (*CAS*), ja zināms.

Nesējviela:

— nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),

— vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

— inhalācijas kameras apraksts, ieskaitot izmērus un tilpumu,

— dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,

— temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,

— gaisa avots un pievadītā/aizvadītā gaisa apstrāde, kā arī izmantotā kondicionēšanas sistēma,

— metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,

— spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),

— ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta sistēmā (visa ķermeņa ekspozīcija),

— testa atmosfēras īslaicīgā homogenitāte/stabilitāte,

— temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,

— gaisa caurplūduma rādītāji, gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniekslodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),

— attiecīgā gadījumā informācija par skābekļa un oglekļa dioksīda mērīšanai izmantoto aprīkojumu,

— laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),

— tilpuma nomaiņu skaits stundā,

— mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

— pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,

— nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,

▼M4

— visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (piemēram, mg/l, mg/m^3 utt.) Iekavās var uzrādīt arī tilpuma vienības (piemēram, ppm, ppb utt.),

— daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (*MMAD*) un ģeometriskā standartnovirze (σg), arī to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāsniedz atsevišķu daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, ieskaitot informāciju par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai. Gadījumos, kad mehāniski procesi ir, iespējams, mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu, ziņojumā jāatspoguļo tādu analīžu rezultāti, kurās verificēts testējamās ķīmiskās vielas sastāvs,

— apraksts par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un pakļauj dzīvniekus tās iedarbībai (vēlams, kopā ar shēmu),

— sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),

— testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

— tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,

— tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,

— tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu lieluma sadalījuma un *MMAD* un σ_g aprēķinus,

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),

— pētījuma dienās ievāktā informācija par katra dzīvnieka svaru, nāves datums un laiks, ja nāve iestājusies pirms paredzētās eitanāzijas, toksicitātes pazīmju parādīšanās gaita un par katru dzīvnieku norāde, vai šīs pazīmes bijušas atgriezeniskas,

— katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,

— mirstības aplēses (piemēram, LC_{50}, LD_{01}) ar ticamības robežu 95 % un sakarības slīpums (ja paredzēts izvērtēšanas metodē),

— statistiskais sakars, arī aplēses par pakāpes rādītāju n ($C \times t$ protokols). Jānorāda izmantotās statistiskās programmatūras nosaukums.

▼M4

Rezultātu interpretācija un komentāri:

— īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,

— ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,

— jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (8) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,

— ja tests saskaņā ar šā pielikuma B.52. nodaļu (4) ticis pārtraukts, lai pārietu uz B.2. testēšanas metodi, tas jāpamato,

— pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,

— jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs).

LITERATŪRA

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Pieejams: 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. Pieejams: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(3) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

(4) Šā pielikuma B.52. nodaļa "Akūtā inhalācijas toksicitāte: akūtās toksicitātes klases metode".

(5) Šā pielikuma B.40. nodaļa "*In vitro* ādas erozija: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".

(6) Šā pielikuma B.40.a nodaļa "Ādas erozijas *in vitro* tests: cilvēka ādas modeļa tests".

(7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Pieejams: 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. Pieejams: 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. Pieejams: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

1. papildinājums

C × t protokols

1. Koncentrācija × laiks ($C \times t$) vairākpakāpju pētījumu var uzskatīt par tradicionālā protokola alternatīvu attiecībā uz inhalācijas toksicitātes novērtēšanu (12) (13) (14). To ir vēlams veikt gadījumā, kad konkrēta regulatīva vai zinātniska vajadzība (piemēram, plānošana attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās vai zemes izmantošanas plānošana) nosaka, ka ir vajadzīga dzīvnieku testēšana ar vairākiem ekspozīcijas ilgumiem. Šo pieeju parasti sāk īstenot, veicot testu ar robežkoncentrāciju (I ekspozīcijas seanss) un pakļaujot dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai piecos dažādos ilgumos (piemēram, 15, 30, 60, 120 un 240 minūtes), lai vienā ekspozīcijas seansā iegūtu vairākus ekspozīcijas ilgumus (sk. 1. attēlu). Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l. Šos līmeņus drīkst pārsniegt tikai tad, ja regulatīva vai zinātniska vajadzība nosaka, ka testi jāveic ar augstākiem līmeņiem (sk. B.2. nodaļas pamatteksta 37. punktu).

2. Situācijās, kurās nepietiek vai vispār trūkst informācijas par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, jāveic devu diapazona pētījums, kur grupas ar ne vairāk kā trijiem katra dzimuma dzīvniekiem pakļauj pētījuma vadītāja izraudzītu mērķkoncentrāciju iedarbībai parasti 240 minūtes.

3. Ja I ekspozīcijas seansā testu veic ar robežkoncentrāciju un ja novērotā mirstība ir zem 50 %, papildu testi nav vajadzīgi. Ja regulatīva vai zinātniska vajadzība nosaka, ka koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarība ir jānosaka ar augstākiem līmeņiem nekā norādītā robežkoncentrācija, nākamā ekspozīcija jāveic ar augstāku līmeni, piemēram, divreiz augstāku par robežkoncentrāciju (t. i., 2L 1. attēlā).

4. Ja ar robežkoncentrāciju tiek novērota toksicitāte, ir vajadzīga papildu testēšana (galvenais pētījums). Šīs papildu ekspozīcijas īsteno vai nu ar zemākām koncentrācijām (1. attēlā: II, III vai IV' ekspozīcijas seanss), vai ar augstākām koncentrācijām, izmantojot mazākus ilgumus (1. attēlā: IV ekspozīcijas seanss), kuri ir koriģēti un starp kuriem nav tik liels solis.

5. Testu (sākotnējā koncentrācija un papildu koncentrācijas) veic, izmantojot vienu dzīvnieku no katra dzimuma uz koncentrācijas/laika kombināciju vai divus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus uz koncentrācijas/laika kombināciju. Dažos gadījumos pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot divas katra dzimuma žurkas uz koncentrācijas/laika kombināciju (vai četrus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus uz koncentrācijas/laika kombināciju) (15). Katrai koncentrācijas un laika kombinācijai izmantojot divus dzīvniekus no katra dzimuma, attiecībā uz šeit aprakstīto protokolu mazinās aplēšu sistemātiskā kļūda un izkliede, pieaug aplēses sekmīguma koeficients un uzlabojas ticamības intervāla segums. Papildu informācija ir sniegta *GD 39* (2).

6. Katru ekspozīciju ir vēlams veikt vienas dienas ietvaros. Nākamā ekspozīcija jāveic tikai tad, kad ir gūta pietiekama pārliecība par izdzīvojušajiem dzīvniekiem, un tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju un nākamās ekspozīcijas seansa ilgumu. Ieteicams katru ekspozīcijas seansu sākt ar grupu, kura iedarbībai tiks pakļauta visilgāko laiku, piemēram, 240 minūšu ekspozīcijas grupu, kam seko 120 minūšu ekspozīcijas grupa utt. Ja dzīvnieki, piemēram, 240 minūšu grupā, nobeidzas pēc 90 minūtēm vai tiem izpaužas smagas toksiskas iedarbības pazīmes (piemēram, ļoti izteiktas pārmaiņas elpošanā, piemēram, apgrūtināta elpošana), nebūtu nozīmes iedarbībai pakļaut 120 minūšu grupu, jo, visticamāk, tiktu novērota 100 % mirstība. Tādējādi pētījuma vadītājam šai koncentrācijai ir jāizvēlas mazāki ekspozīcijas ilgumi (piemēram, 90, 65, 45, 33 un 25 minūtes).

▼M4

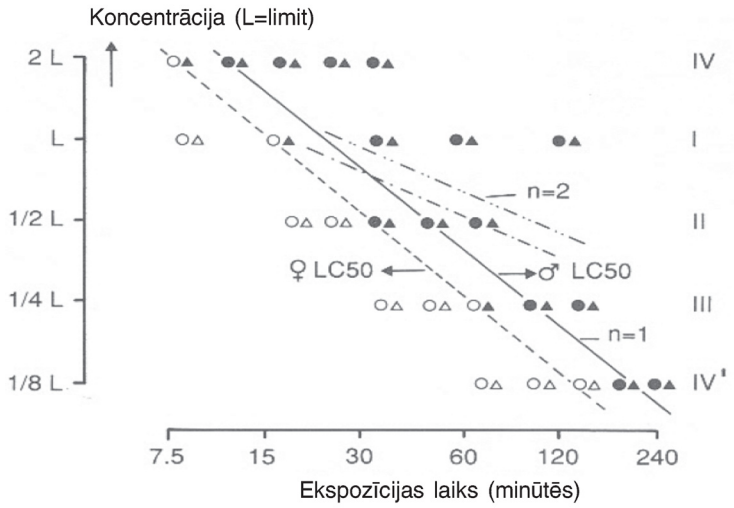
7. Koncentrācija kamerā ir regulāri jāmēra, lai katram ekspozīcijas ilgumam noteiktu laiciski svērto vidējo koncentrāciju. Kad vien iespējams, statistiskajā analīzē ir jāizmanto katra dzīvnieka nāves iestāšanās laiks (nevis ekspozīcijas ilgums).

8. Lai identificētu datu nepārtrauktības pārrāvumu uz koncentrācijas un laika līknes (sk. 1. attēlu), ir jāanalizē pirmo četru ekspozīcijas seansu rezultāti. Ja dati nav pietiekami piemēroti, var veikt papildu ekspozīciju (5. koncentrācija). Koncentrācija un ekspozīcijas ilgumi 5. ekspozīcijai jāizvēlas tā, lai novērstu šo pārrāvumu.

9. Visus ekspozīcijas seansus (ieskaitot pirmo ekspozīcijas seansu) izmantos, lai aprēķinātu koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarību, izmantojot statistisko analīzi (16). Ja iespējams, katram $C \times t$ intervālam ir jāizmanto laiciski svērtā vidējā koncentrācija un ekspozīcijas ilgums līdz nāves brīdim (ja nāve iestājas ekspozīcijas laikā).

*1. **attēls***

Koncentrācijas, laika un žurku mirstības sakarības hipotētisks attēlojums



Neiekrāsotie simboli = izdzīvojušie dzīvnieki; iekrāsotie simboli = nobeigušies dzīvnieki

Trīsstūri = mātītes; apļi = tēviņi

Nepārtrauktā līnija = LC_{50} vērtības (7,5–240 minūšu diapazonā) tēviņiem ar n = 1

Pārtrauktā līnija = LC_{50} vērtības (7,5–240 minūšu diapazonā) mātītēm ar n = 1

Punktotā līnija = hipotētisko LC_{50} vērtību līnija tēviņiem un mātītēm, ja n būtu bijis vienāds ar 2 (12)

Glosārijs

Koncentrācija:

Ekspozīcijas laiks:

▼M4

10. Turpmāk sniegts vairākpakāpju procedūras piemērs.

I ekspozīcijas seanss. Testa veikšana ar robežkoncentrāciju (sk. 1. attēlu)

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki ([a])

— Mērķkoncentrācija ([b]) = robežkoncentrācija

— Šīs mērķkoncentrācijas iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas attiecīgi uz 15, 30, 60, 120 un 240 minūtēm

↓

II ekspozīcijas seanss ([c]). Galvenais pētījums

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki

— Zemākas koncentrācijas ([d]) (1/2L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients √2; sk. 1. attēlu)

↓

III ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki

— Zemākas koncentrācijas ([d]) (1/4L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients √2; sk. 1. attēlu)

↓

IV' ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki

— Zemākas koncentrācijas ([d]) (1/8L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients √2; sk. 1. attēlu)

↓ vai

([a]) Ja informācija par uzņēmību atkarībā no dzimuma nav pieejama, izmanto abu dzimumu žurkas, t. i., vienu dzīvnieku no katra dzimuma uz koncentrāciju. Pamatojoties uz esošo informāciju vai ja šā ekspozīcijas seansa laikā kļūst skaidrs, ka kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks, turpmākajā testā izmanto 10 uzņēmīgā dzimuma dzīvniekus (divus dzīvniekus uz koncentrācijas un ilguma kombināciju) katram koncentrācijas līmenim.

([b]) Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l. Ja tiek prognozēts toksiskums vai ja to nosaka devu diapazona pētījuma rezultāti, jāizvēlas zemākas sākumkoncentrācijas. Ja to nosaka regulatīvas vai zinātniskas vajadzības, var izmantot augstākas koncentrācijas.

([c]) Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvniekus vēlams pakļaut tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdzīvojušajiem dzīvniekiem. Tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju un ilgumus nākamajam ekspozīcijas seansam.

([d]) Atkarībā no minimālās devas (koncentrācija × laiks), kas izraisīja mirstību testā ar sākotnējo koncentrāciju (pirmajā ekspozīcijas seansā), izvēlas nākamo koncentrācijas un ekspozīcijas ilgumu kombināciju. Parasti koncentrāciju divreiz pazemināsa (1/2L) un dzīvniekus pakļaus iedarbībai jaunā ilgumu diapazonā ar smalkāku režģi, kurā ģeometriskais koeficients starp ekspozīcijas ilgumiem ir 1,4 (√2; sk. 11. atsauci), un vidus punkts ir laiks, kādā pirmajā ekspozīcijā novērots zemākais letālās devas (laiks × koncentrācija) līmenis. Šajā attēlā (1. attēls) mirstību I ekspozīcijas seansā pirmo reizi novēroja 15. minūtē, tāpēc II seansā ilgumus centrēja ap 30 min, proti tie bija 15, 21, 30, 42 un 60 min. Pēc pirmajām divām ekspozīcijām ir ļoti ieteicams datus atspoguļot attēlā, kas līdzīgs iepriekšējam, un pārbaudīt, vai koncentrācijas un laika sakarības leņķis ir 45 grādi (n = 1) vai tomēr koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarības līkne ir mazāk stāva (piemēram, n = 2) vai stāvāka (piemēram, n = 0,8). Ja tā nav tik stāva vai ir stāvāka, ir ļoti ieteicams attiecīgi koriģēt koncentrācijas un ilgumus.

▼M4

IV ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki

— Augstākas koncentrācijas (e) (2L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients $\sqrt{2}$; sk. 1. attēlu)

C × t protokola rezultātu matemātiskā apstrāde

11. *C × t* procedūra ar četrām vai piecām ekspozīcijas koncentrācijām un pieciem ilgumiem nodrošinās attiecīgi 20 vai 25 datu punktus. Ar šiem datu punktiem *C × t* sakarību var aprēķināt, izmantojot statistisko analīzi (16):

1. vienādojums:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

kur C = koncentrācija; t = ekspozīcijas ilgums, vai

2. vienādojums:

$$Atbildesreakcija = f(C^n t)$$

kur $n = b_1 / b_2$.

Ar 1. vienādojumu var aprēķināt LC_{50} vērtību attiecīgajam ilgumam (piemēram, 4 stundām, 1 stundai, 30 minūtēm vai jebkuram ilgumam testa ilgumu diapazonā), izmantojot P = 5 (50 % atbildes reakcija). Jāņem vērā, ka Hābera likums ir piemērojams tikai tad, ja n = 1. LC_{01} var aprēķināt, izmantojot P = 2,67.

(e) Dažos gadījumos var būt nepieciešams palielināt koncentrāciju (2L) un mainīt ekspozīcijas ilgumu diapazonu, izmantojot vēl smalkāku režģi, kurā ģeometriskais koeficients starp blakus esošiem ilgumiem ir 1,4 ($\sqrt{2}$), un viduspunkts ir laiks, kādā pirmajā ekspozīcijā ir novērots zemākais letālās koncentrācijas līmenis. Vēlams, lai minimālais ekspozīcijas ilgums pārsniegtu piecas minūtes, bet maksimālais ilgums nepārsniegtu astoņas stundas.;

▼B

B.3. **AKŪTĀ TOKSICITĀTE (ĀDAS)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Ar testa vielu pakāpeniskās devās apstrādā ādu vairāku izmēģinājumu grupu dzīvniekiem, katrai grupai saņemot vienādu devu. Pēc tam novēro toksisko iedarbību un reģistrē nāves gadījumus. Testa laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

Dzīvnieki, kas uzrāda smagas un ilgstošas briesmu sajūtas un sāpju pazīmes, var būt humāni jānogalina. Tāda testa devu došana, par ko ir zināms, ka tā izraisa izteiktas sāpes un briesmu sajūtu kodīgo vai kairinošo īpašību dēļ, nav jāveic.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus eksperimenta būros pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Pirms testa veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus pēc nejaušības principa sadala izmēģinājumu grupās. Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem nocērp vai noskuj apmatojumu uz muguras. Cērpot vai skujot apmatojumu, nedrīkst nobrāzt ādu, jo tas var izmainīt ādas caurlaidību. Testa vielas uzlikšanai jāsagatavo vismaz 10 % ķermeņa virsmas. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, testa viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu nesēju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Ja izmanto nesēju, ir jāņem vērā, ka tas var izmainīt ādas caurlaidību attiecībā pret testa vielu. Analizējamos šķidrumus parasti neatšķaida.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājuma dzīvnieki*

Var izmantot pieaugušas žurkas vai trušus. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet tad šī izvēle jāpamato. Jāizmanto parasti lietojamās laboratorijas dzīvnieku līnijas. Katra dzimuma dzīvnieku svara atšķirības testa sākumā nedrīkst pārsniegt ± 20 % no attiecīgā vidējā lieluma.

▼B

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Katrā devas līmenī izmanto vismaz piecus dzīvniekus. Visiem jābūt viena dzimuma. Ja izmanto mātītes, tās nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja ir pieejama informācija, kas rāda, ka viens dzimums ir izteikti jutīgāks, devas ir jādod šā dzimuma dzīvniekiem.

Piezīme. Akūtās toksicitātes testā ar dzīvniekiem, kas ir augstāki par grauzējiem, ir jāapsver mazāka skaita izmantošana. Devas ir rūpīgi jāizvēlas, un jāpieliek visas pūles, lai nepārsniegtu vidēji toksiskas devas. Tādos testos ir jāizvairās dot testa vielu letālās devās.

1.6.2.3. *Devu līmeņi*

Jāizvēlas vairākas devas, vismaz trīs devas pietiekami plašā diapazonā, lai testa grupās būtu iespējams novērot atšķirīgu toksisko iedarbību un mirstību. Izvēloties devu līmeņus, jāņem vērā tas, ka vielas var būt kairinošas vai kodīgas. Jāiegūst pietiekami daudz datu, lai varētu noskaidrot iedarbības atkarību no devas un, ja iespējams, pienācīgi noteikt LD_{50}.

1.6.2.4. *Pieļaujamības tests*

Pieļaujamības testu pie viena devas līmeņa, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara, var izdarīt piecu vīriešu dzimuma un piecu sieviešu dzimuma dzīvnieku grupai, izmantojot turpmāk aprakstīto procedūru. Ja rodas ar savienojumu saistīta mirstība, var būt jāapsver pilns pētījums.

1.6.2.5. *Novērošanas laika posms*

Dzīvniekus novēro vismaz 14 dienas. Tomēr novērošanas ilgumu var ietekmēt dažādi apstākļi. To nosaka novērotās toksiskās reakcijas, to iestāšanās ātrums un dzīvnieku atveseļošanās ilgums; tāpēc vajadzības gadījumā to var pagarināt. Svarīgi zināt brīdi, kad parādās un izzūd toksiskuma pazīmes, to ilgumu un brīdi, kurā iestājas nāve, jo īpaši tad, ja tā iestājas novēloti.

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Testa vielu vienmērīgi uztriepj uz ādas, kuras platība veido apmēram 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamo ādas platību var samazināt, bet tai jābūt pēc iespējas lielākai, un viela jāuztriepj, cik vien var plāni un vienmērīgi.

Testa vielas saskari ar ādu visā 24 stundu garajā iedarbības laikā nodrošina ar porainas marles pārsēju un nekairinošu plāksteri. Apstrādātā vieta pēc tam vēl jāpārklāj tā, lai nostiprinātu marles pārsēju ar testa vielu un lai dzīvnieki nevarētu to norīt. Lai testa viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nebūtu vēlama.

▼B

Beidzoties iedarbības laikam, testa vielas atlikumu, ja praktiski iespējams, noņem ar ūdeni vai kādu citu piemērotu ādas mazgāšanas līdzekli.

Jāveic regulāri novērojumi, un tie uzreiz jāprotokolē. Atsevišķi pieraksta datus par katru dzīvnieku. Pirmajā dienā novērošanu veic biežāk. Katru darbdienu vismaz vienreiz veic rūpīgu klīnisko izmeklēšanu, pārējos novērojumus veic ik dienas, pienācīgi gādājot par to, lai samazinātu izmēģinājumu dzīvnieku zudumus, piemēram, mirušos dzīvniekus secē vai ievieto ledusskapī, bet vārgus un mirstošus dzīvniekus nošķir vai nogalina.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar apmatojumu, apstrādāto ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Īpaša vērība jāpievērš trīcei, konvulsijām, salivācijai, caurejai, letarģijai, miegam un komas stāvoklim. Nāves iestāšanās brīdi reģistrē, cik vien precīzi iespējams. Dzīvniekus, kas miruši testa laikā, secē; beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus. Reģistrē visas novērotās patoloģiskās izmaiņas. Vajadzības gadījumā ņem audu paraugus histopatoloģiskai izmeklēšanai.

Toksicitātes novērtēšana otram dzimumam

Pēc pētījuma pabeigšanas ar vienu dzimumu vismaz vienai otra dzimuma piecu dzīvnieku grupai dod devu, lai noskaidrotu, vai šā dzimuma dzīvnieki nav izteikti jutīgāki pret testa vielu. Mazāka dzīvnieku skaita izmantošana var būt pamatota konkrētos apstākļos. Ja ir pieejama pietiekama informācija, lai parādītu, ka testētā dzimuma dzīvnieki ir izteikti jutīgāki, var iztikt bez otra dzimuma dzīvnieku testēšanas.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā pirms testa, nāves iestāšanās brīdi katram dzīvniekam, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas citas toksiskuma pazīmes, toksiskās iedarbības izpausmes un autopsijas rezultātus. Katra dzīvnieka svaru reģistrē īsi pirms testa vielas pielietošanas, pēc nedēļas un nāves iestāšanās brīdī; ja dzīvnieki izdzīvo ilgāk nekā vienu dienu, jāaprēķina un jāpieraksta svara izmaiņas. Dzīvniekus, kas ir humāni nogalināti ar savienojumu saistīto briesmu sajūtas un sāpju dēļ, reģistrē kā mirušus saistībā ar savienojumu. LD_{50} aprēķina pēc atzītas metodes.

Izvērtējot datus, jānoskaidro, vai pastāv korelācija starp testa vielas iedarbību un novēroto anomāliju biežumu un smagumu, ieskaitot uzvedības izmaiņas, klīniskās novirzes, makropatoloģiskās izmaiņas, ķermeņa svara svārstības, mirstību un pārējos toksikoloģiskos rādītājus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

▼B

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas un barošanas apstākļi, barība u. tml.,

— testa apstākļi (iekļaujot ādas notīrīšanas metodi un pārsējuma veidu – okluzīvs vai neokluzīvs),

— izmantotās devas (vajadzības gadījumā arī nesējs un koncentrācija),

— devu saņēmušo dzīvnieku dzimums,

— atbildes reakcijas datu tabula pēc dzimuma un devu līmeņa (t. i., testa laikā nobeigušos vai nogalināto dzīvnieku skaits; dzīvnieku skaits, kam parādās toksiskuma pazīmes; iedarbībai pakļauto dzīvnieku skaits),

— nāves brīdis pēc devas saņemšanas, dzīvnieku humānās nogalināšanas iemesli un kritēriji,

— visi novērojumi,

— LD_{50} lielums, kas noteikts pēc 14 dienām dzimumam, kam izdarīts pilns pētījums, un noteikšanas metode,

— LD_{50} 95 % ticamības intervāls (ja var aprēķināt),

— devas/mirstības līkne un slīpuma koeficients (ja to ļauj noteikšanas metode),

— autopsijas konstatācijas,

— histopatoloģiskas konstatācijas,

— testa rezultāti ar otru dzimumu,

— rezultātu apspriešana (īpaša uzmanība jāpievērš tam, kāda ietekme dzīvnieku humānai nogalināšanai testa laikā varētu būt uz aprēķināto LD_{50} lielumu),

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

▼M8

B.4. **AKŪTS ĀDAS KAIRINĀJUMS/KOROZIJA (KODĪGA IEDARBĪBA UZ ĀDU)**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 404 (2015) aprakstītajam. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas tiek regulāri pārskatītas, lai nodrošinātu, ka tās atspoguļo zinātnes jaunākās atziņas. Pārskatot ESAO *TG* Nr. 404, īpaši uzmanīgi tika apsvērts, ko iespējams uzlabot dzīvnieku labturības aspektos, kā arī izvērtēta visa par testējamo ķimikāliju jau esošā informācija, lai nebūtu jāveic lieka testēšana ar laboratorijas dzīvniekiem. Atjauninātajā ESAO *TG* Nr. 404 (sākotnēji pieņemta 1981. gadā, pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) ir atsauce uz *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion (IATA)* (Norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju) (1), kurā testēšanai attiecībā uz ādas kairinājumu un ādas koroziju ierosināta modulāra pieeja. *IATA* apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (1). Bez tam attiecīgā gadījumā minētā vadlīnija ieteic sākotnējā *in vivo* testā trīs kompreses dzīvniekam aplicēt nevis vienlaikus, bet secīgi.

2. Ādas kairinājuma un korozijas definīcijas sniegtas šīs testēšanas metodes apraksta papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Tiklab zinātnes kā dzīvnieku labturības interesēs ir neveikt testēšanu *in vivo*, iekams visi dati, kas relevanti attiecībā uz testējamās ķimikālijas potenciālajām ādai kodīgajām/kairinošajām īpašībām, nav izvērtēti *Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Corrosion and Irritation* (Norādījumu dokumentā par integrētu pieeju ādas korozijas un kairinājuma testēšanu un novērtēšanu), proti, tā trijās daļās un attiecīgajos moduļos (1) aprakstītajā pierādījumsvara (*WoE*) analīzē. Īsumā — 1. daļā noteikts, ka esošos datus aplūko septiņos moduļos, kuri aptver datus par cilvēku, *in vivo* pētījumos iegūtos datus, attiecīgos *in vitro* datus, datus par fizikālķīmiskajām īpašībām (piem., pH, jo īpaši stiprs skābums vai sārmainums) un datus, kas iegūti ar metodēm, kuras neparedz testēšanu. 2. daļa nosaka, kā izdarāma *WoE* analīze. Ja *WoE* analīze joprojām nesniedz skaidrus rezultātus, jāveic 3. daļā aprakstītā papildu testēšana, sākot ar *in vitro* metodēm, bet *in vivo* testēšana jāizmanto kā pēdējā iespēja. Tātad šāda analīze mazina nepieciešamību veikt *in vivo* testēšanu attiecībā uz tādu testējamo ķimikāliju kodīgajām/kairinošajām īpašībām, attiecībā uz kurām par šiem diviem beigupunktiem pietiekami daudz datu jau iegūts citos pētījumos.

IN VIVO TESTA PRINCIPS

4. Uz eksperimenta dzīvnieku ādas aplicē vienu devu testējamās ķimikālijas. Par kontroli izmanto tā paša testā izmantotā dzīvnieka ādas neskartās daļas. Nosaka kairinājuma/korozijas pakāpi, ko ar noteiktiem starplaikiem nolasa, novērtē ar atzīmēm un ietekmes pilnīgai izvērtēšanai apraksta sīkāk. Pētījuma ilgumam jābūt tādam, lai varētu novērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu.

▼M8

5. Dzīvnieki, kuriem jebkurā testa posmā novērojamas pastāvīgas stipru ciešanu un/vai sāpju pazīmes, humāni jānonāvē, un testējamā ķimikālija attiecīgi jānovērtē. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu humāni nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, sniegti atsevišķā norādījumu dokumentā (2).

SAGATAVOŠANĀS IN VIVO TESTAM

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

6. Piemērotākais laboratorijas dzīvnieks ir albīnais trusis, un izmanto jaunus veselus pieaugušus dzīvniekus. Ja izmanto citu sugu dzīvniekus, tas attiecīgi jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Apmēram 24 stundas pirms testa dzīvniekiem ķermeņa mugurdaļā rūpīgi nocērpj apmatojumu. Jāraugās ādu nesaskrāpēt un jāizmanto tikai dzīvnieki ar veselu un nebojātu ādu.

8. Dažām trušu līnijām ir bieza apspalvojuma vietas, kas zināmos gadalaikos kļūst izteiktākas. Šādas vietas, kur apmatojums uz ķermeņa ir ļoti blīvs, testēšanai neizmanto.

Turēšanas un barošanas apstākļi

9. Dzīvnieki jātur atsevišķi. Eksperimenta trušu telpas temperatūra ir 20 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim.

TESTA PROCEDŪRA

Testējamās ķimikālijas aplicēšana

10. Testējamo ķimikāliju aplicē uz nelielas ādas virsmas platības (apmēram 6 cm^2), kuru pārklāj ar marles kompresi, ko piestiprina ar nekairinošu plāksteri. Ja tieša aplicēšana nav iespējama (piem., šķidrumiem vai daļai pastu), testējamo ķimikāliju vispirms pārnes uz marles kompreses, kuru pēc tam aplicē uz ādas. Kompresei jāpieguļ ādai, taču ne blīvi, un to panāk, ekspozīcijas laikā izmantojot attiecīgu puspiegulošu pārsēju. Ja testējamo ķimikāliju pārnes uz kompresi, tā ādai jāpiestiprina tā, lai ķimikālijai ar ādu būtu laba saskare un tā uz ādas būtu sadalīta vienmērīgi. Jāpanāk, ka dzīvnieks kompresei nevar pieskarties, tādējādi izslēdzot iespēju, ka testējamā ķimikālija tiek ieēsta vai ieelpota.

11. Šķidras testējamās ķimikālijas parasti pārbauda neatšķaidītas. Testējot cietas vielas (kuras, ja uzskata par nepieciešamu, var saberzt pulverī), testējamā ķimikālija jāsamitrina ar mazāko daudzumu ūdens (vai, ja nepieciešams, cita piemērota nesēja), ar ko pietiek, lai panāktu labu saskari ar ādu. Ja ūdens vietā izmanto citus nesējus, testētās ķimikālijas izraisītā ādas kairinājumā nesēja ietekmei, ja tāda vispār ir, jābūt iespējami minimālai.

12. Ekspozīcijas perioda (parasti četras stundas) beigās testējamās ķimikālijas atliekas no ādas noņem, ja iespējams, ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, kas neietekmē izveidojušos atbildreakciju un nebojā epidermu.

▼M8

Devas līmenis

13. Uz testa anatomiskās vietas aplicē 0,5 ml šķidruma vai 0,5 g cietas vielas vai pastas.

Sākotnējais tests (ādas kairinājuma/korozijas *in vivo* tests ar vienu dzīvnieku)

14. Ja uz pierādījumsvara analīzes vai agrākas *in vitro* testēšanas pamata par attiecīgo testējamo ķimikāliju nospriests, ka tā ir kodīga, kairinoša vai nav klasificēta, tālāka *in vivo* testēšana parasti nav vajadzīga. Tomēr, ja tiek uzskatīts, ka vajadzīgi papildu dati, *in vivo* testu sākotnēji parasti izdara ar vienu dzīvnieku, izmantojot šādu pieeju. Vienam dzīvniekam secīgi aplicē trīs testa kompreses. Pirmo kompresi noņem pēc trim minūtēm. Ja nopietnu ādas reakciju nenovēro, citā vietā aplicē otru kompresi, ko noņem pēc stundas. Ja novērojumi šajā testa posmā liecina, ka ekspozīciju iespējams humāni paildzināt līdz četrām stundām, uzliek trešo kompresi, ko noņem pēc četrām stundām, un novērtē atbildreakciju.

15. Ja pēc kādas no trim secīgām ekspozīcijām tiek novērota kodīga ietekme, testu nekavējoties beidz. Ja pēc pēdējās kompreses noņemšanas kodīgu ietekmi nenovēro, dzīvnieku novēro vēl 14 dienas, ja vien korozija neizveidojas jau pirms šā laika beigām.

16. Ja netiek gaidīts, ka testējamā ķimikālija būs kodīga, bet tā var būt kairinoša, vienam dzīvniekam uz četrām stundām aplicē vienu kompresi.

Apstiprinošs tests (ādas kairinājuma *in vivo* tests, kurā izmanto papildu dzīvniekus)

17. Ja sākotnējā testā kodīga ietekme nav novērota, kairinājuma atbildreakcija vai tās neesība jāapstiprina, izmantojot ne vairāk kā divus papilddzīvniekus, kuriem katram aplicē vienu kompresi, ko tur četras ekspozīcijas stundas. Ja sākotnējā testā novērota kairinoša ietekme, apstiprinājuma testu var veikt secīgi vai divus papildzīvniekus eksponējot vienlaicīgi. Izņēmuma gadījumā, kur sākotnējs tests netiek veikts, diviem vai trijiem dzīvniekiem aplicē vienu kompresi, ko noņem pēc četrām stundām. Ja izmanto divus dzīvniekus un atbildreakcija abiem ir vienāda, turpmāka testēšana nav nepieciešama. Pretējā gadījumā jāveic testi ar vēl vienu dzīvnieku. Neskaidru reakciju izvērtēšanai var būt nepieciešams izmantot papildu dzīvniekus.

Novērošanas periods

18. Ar novērošanas periodu jāpietiek, lai varētu pilnīgi izvērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Taču eksperiments vienmēr jāpārtrauc jebkurā brīdī, kad dzīvniekiem parādās pastāvīgu smagu sāpju vai ciešanu pazīmes. Lai novērtētu ietekmes atgriezeniskumu, pēc komprešu noņemšanas dzīvnieki vēl līdz 14 dienas ilgi jānovēro. Ja iedarbības atgriezeniskumu konstatē pirms 14 dienu perioda beigām, eksperiments tajā brīdī jābeidz.

Klīniskie novērojumi un ādas reakciju pakāpes

19. Visiem dzīvniekiem eritēmas un tūskas pazīmes jāpārbauda un atbildreakcija ar atzīmi jānovērtē 60 minūtes pēc tampona noņemšanas un vēl pēc 24, 48 un 72 stundām. Sākotnējā testā ar vienu dzīvnieku tūlīt pēc kompreses noņemšanas apskata arī testa anatomisko vietu. Ādas reakcijas novērtē pa pakāpēm un reģistrē pēc zemāk dotās pakāpju tabulas. Ja ir ādas bojājums, ko pēc 72 stundām nevar identificēt par kairinājumu vai koroziju, tad, lai

▼M8

noteiktu, vai ietekme ir atgriezeniska, novērošana var būt jāturpina līdz 14. dienai. Papildus kairinājuma novērojumam pilnīgi jāraksturo un jāreģistrē arī jebkāda tāda lokāla toksiska ietekme kā ādas attaukošanās un jebkāda sistēmiski kaitīga ietekme (piem., ietekme uz toksiskuma klīniskajām pazīmēm un ķermeņa masas pārmaiņām). Jāapsver, vai neskaidru atbildreakciju precizēšanai neveikt histopatoloģiskus izmeklējumus.

20. Ādas reakciju iedalīšana pakāpēs neizbēgami ir subjektīva. Lai veicinātu ādas reakciju pakāpju saskaņošanu un palīdzētu testēšanas laboratorijām, novērojumu veicējiem un interpretētājiem, personālam, kas veic novērojumus, jābūt pietiekami apmācītam par izmantojamo atzīmju sistēmu (sk. tabulu zemāk). Var noderēt ilustrēti norādījumi par ādas kairinājuma un citu bojājumu pakāpēm (3).

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

21. Pētījuma rezultāti testēšanas galīgajā pārskatā jāapkopo tabulas veidā, aptverot visus 24. punkta sarakstā norādītos jautājumus.

Rezultātu izvērtēšana

22. Ādas kairinājuma novērtējuma atzīmes jāizvērtē kopsakarā ar bojājumu dabu un smagumu un to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Konkrētās novērtējuma atzīmes nav absolūts materiāla kairinošo īpašību standarts, jo tiek novērtēta arī testējamā materiāla cita veida ietekme. Individuālās novērtējuma atzīmes būtu uzskatāmas par bāzesvērtībām, kuras jāizvērtē kombinācijā ar visiem citiem pētījumā veiktajiem novērojumiem.

23. Kairinājuma atbildreakcijas izvērtēšanā jāņem vērā, vai ādas bojājumi ir atgriezeniski. Ja tādas reakcijas kā apmatojuma zaudējums (ierobežotā platībā), hiperkeratoze (ādas pārragošanās), hiperplāzija un plaisāšana saglabājas līdz 14 dienu ilga novērošanas perioda beigām, testējamā ķimikālija jāuzskata par kairinošu.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā jānorāda šāda informācija.

In vivo testēšanas pamatojums:

— jau esošu testēšanas datu, arī ar secīgas testēšanas stratēģiju iegūtu rezultātu pierādījumsvara analīze;

— relevantu agrākā testēšanā iegūtu datu apraksts;

— katrā testēšanas stratēģijas posmā iegūtie dati;

— izdarīto *in vitro* testu apraksts, arī detalizēta informācija par procedūrām un ar testējamajām vielām un standartvielām iegūtajiem rezultātiem;

— *in vivo* pētījuma veikšanai nepieciešamā pierādījumsvara analīze.

Testējamā ķimikālija:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

▼**M8**

— daudzkomponentu vielas, maisījumi un vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli (UVCB): iespējami izsmeļoši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana) ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

— identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;

— nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Testa dzīvnieks (dzīvnieki):

— izmantotais celms/līnija, izraudzīšanās pamatojums gadījumos, kur neizmanto albīnos trušus;

— katra dzimuma dzīvnieku skaits;

— katra dzīvnieka masa testa sākumā un beigās;

— vecums pētījuma sākumā;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.

Testēšanas nosacījumi:

— kompreses vietas sagatavošanas paņēmiens;

— detalizēta informācija par izmantotajiem kompreses materiāliem un kompreses uzlikšanas paņēmienu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu, aplicēšanu un noņemšanu.

Rezultāti:

— tabulā apkopotas atzīmes par katram dzīvniekam novēroto kairinājuma/-korozijas veida atbildreakciju visos mērītajos laika punktos;

— visu novēroto bojājumu apraksts;

— stāstījumveida apraksts par novērotā kairinājuma vai korozijas dabu un pakāpi un jebkādi histopatoloģiski konstatējumi;

— papildus ādas kairinājuma vai korozijas aprakstam — apraksts par vēl citu nelabvēlīgu vietēju (piem., ādas attaukošanās) vai sistēmisku ietekmi.

▼**M8**

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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.

(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), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tabula

Ādas reakcijas klasificēšana

Eritēmas un nekrotisku kreveļu veidošanās

Eritēmas nav	0
Ļoti neliela eritēma (tikko manāma)	1
Labi saskatāma eritēma	2
Vidēja līdz smaga eritēma	3
Smaga eritrēma (liellopa gaļas sarkanums) ar izveidojušos nekrotisku kreveli, kas liedz iespēju noteikt eritēmas pakāpi	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Tūskas veidošanās

Tūskas nav	0
Ļoti neliela tūska (tikko manāma)	1
Neliela tūska (skarto vietu viegli noteikt pēc izteikta pietūkuma)	2
Vidēja tūska (pietūkums apm. 1 mm)	3
Smaga tūska (pietūkums vairāk nekā 1 mm, arī aiz eksponētā ādas laukuma)	4

Maksimālie iespējamie punkti: 4

Neskaidras atbildreakcijas var precizēt ar histopatoloģiskiem izmeklējumiem.

▼**M8**

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām.

Ādas korozija ir neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju uz ādas aplicējot līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M7

B.5. AKŪTS ACU KAIRINĀJUMS/KOROZIJA

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 405 (2012). ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas tiek regulāri pārskatītas, lai nodrošinātu, ka tās atspoguļo jaunākos sasniegumus zinātnē. Iepriekšējās šīs testēšanas vadlīnijas pārskatīšanas reizēs īpaša vērība tika veltīta iespējamajiem uzlabojumiem, kas saistīti ar visas par testējamo ķimikāliju pieejamās informācijas izvērtēšanu, lai nebūtu jāveic nevajadzīgi testi ar laboratorijas dzīvniekiem un tādējādi tiktu ievērotas dzīvnieku labturības prasības. *TG* 405 (pieņemti 1981. gadā un atjaunināti 1987., 2002. un 2012. gadā) ir iekļauts ieteikums pirms aprakstītā akūta acu kairinājuma/korozijas *in vivo* testa veikšanas veikt relevanto esošo datu pierādījumu svara analīzi (1). Ja esošie dati ir nepietiekami, tos ieteicams papildināt secīgā testēšanā (2) (3). Testēšanas stratēģijā ietilpst validētu un vispārpieņemtu *in vitro* testu veikšana, un tā pievienota kā papildinājums šai testēšanas metodei. Regulas (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*) ([1]), vajadzībām attiecīgajos *ECHA* norādījumos ir ietverta arī integrēta testēšanas stratēģija (21). Testi ar dzīvniekiem jāveic vienīgi tad, ja tāda nepieciešamība ir konstatēta pēc pieejamo alternatīvo metožu apsvēršanas un piemēroto metožu izmantošanas. Šīs atjauninātās testēšanas metodes izstrādes laikā ir konstatēti gadījumi, kad šīs testēšanas metodes izmantošana joprojām ir nepieciešama vai to prasa atsevišķi reglamentējošie noteikumi.

Jaunākais atjauninājums galvenokārt ir vērsts uz analgētisko līdzekļu un anestēzijas līdzekļu izmantošanu un neietekmē testēšanas vadlīnijas pamatkoncepciju un struktūru. *ICCVAM* ([2]) kopā ar starptautisku neatkarīgu profesionālvērtēšanas komisiju pārskatīja vietējās anestēzijas līdzekļu, sistēmisko analgētisko līdzekļu regulāra izmantojuma un humānu beigupunktu lietderīgumu un ierobežojumus attiecībā uz acu kairinājumu *in vivo* drošuma testos (12). Šajā pārskatā tika secināts, ka vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analgētisko līdzekļu izmantojums varētu novērst visas vai gandrīz visas sāpes un diskomfortu, neietekmējot testa rezultātu, un tika ieteikts vienmēr izmantot šīs vielas. Šajā testēšanas metodē ir ņemts vērā minētais pārskats. Vietējās anestēzijas līdzekļi, sistēmiskie analgētiskie līdzekļi un humāni beigupunkti akūta acu kairinājuma un korozijas *in vivo* testēšanā jāizmanto pastāvīgi. To nelietošana jāpamato. Šajā metodē aprakstītie uzlabojumi vairumā testēšanas gadījumu, kuros joprojām nepieciešams veikt acu drošuma *in vivo* testēšanu, dzīvniekiem būtiski samazinās vai novērsīs sāpes un diskomfortu.

Līdzsvarotā, preventīvā atsāpināšanā jāiekļauj: i) standarta pirmapstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli (piemēram, proparakaīnu vai tetrakaīnu) un sistēmisko analgētisko līdzekli (piemēram, buprenorfīnu); ii) standarta pēcapstrāde ar sistēmiskajiem analgētiskajiem līdzekļiem (piemēram, buprenorfīnu un meloksikāmu); iii) dzīvnieku ar klīniskām sāpju un/vai diskomforta pazīmēm plānveida novērošana, monitorēšana un reģistrēšana; un iv) visu acu bojājumu veida,

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*), un ar kuru izveido Eiropas Ķimikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, 93/67/EEK, 93/105/EK un 2000/21/EK. OV L 304, 22.11.2007., 1. lpp.

([2]) ASV Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

▼M7

smaguma pakāpes un attīstības plānveida novērošana, uzraudzība un reģistrēšana. Sīkāka informācija ir sniegta turpmāk aprakstītajās atjauninātajās procedūrās. Pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas nedrīkst ievadīt nevienu citu vietējās anestēzijas vai analgētisko līdzekli, lai neradītu traucējumus pētījumā. Analgētiskos līdzekļus ar pretiekaisuma iedarbību (piemēram, meloksikāmu) nedrīkst aplicēt topikāli, un sistēmiski izmantotās devas nedrīkst mainīt ietekmi uz acīm.

Definīcijas ir izklāstītas šīs testēšanas metodes papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Gan zinātniskās precizitātes dēļ, gan ņemot vērā dzīvnieku labturības apsvērumus, *in vivo* testi nav jāveic, kamēr pierādījumu svara analīzē nav izvērtēti visi pieejamie relevantie dati par ķimikālijas iespējamo korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm. Tie ir ar cilvēkiem un/vai laboratorijas dzīvniekiem veiktajos pētījumos iegūtie dati, pierādījumi par vienas vai vairāku strukturāli radniecīgu vielu vai šādu vielu maisījumu korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm, dati, kas liecina, ka attiecīgajai ķimikālijai ir liels skābums vai sārmainība (4) (5), kā arī validētos un vispārpieņemtos *in vitro* vai *ex vivo* testos iegūti rezultāti par ādas koroziju un korozīvo/kairinošo ietekmi uz acīm (6) (13) (14) (15) (16) (17). Pētījumi var būt veikti pirms pierādījumu svara analīzes vai tās dēļ.

Dažu ķimikāliju gadījumā šāda analīze var norādīt uz nepieciešamību veikt *in vivo* pētījumus par to potenciālu izraisīt acu koroziju/kairinājumu. Visos tādos gadījumos pirms *in vivo* acu testa apsvēršanas ieteicams vispirms veikt pētījumu par ķimikālijas korozīvo ietekmi uz ādu *in vitro* un/vai *in vivo* un to izvērtēt saskaņā ar secīgās testēšanas stratēģiju testēšanas metodē B.4. (7) vai *ECHA* norādījumos (21) aprakstīto integrētās testēšanas stratēģiju.

Secīgās testēšanas stratēģija, kas ietver acu korozijas/kairinājuma validēto *in vitro* vai *ex vivo* testu veikšanu, ir ietverta kā papildinājums šai testēšanas metodei un — *REACH* regulas izpildei — *ECHA* norādījumos (21). Pirms *in vivo* testu veikšanas ieteicams izpildīt šādu testēšanas stratēģiju. Attiecībā uz jaunām ķimikālijām ieteicams izmantot pakāpeniskas testēšanas pieeju, lai iegūtu zinātniski pamatotus datus par ķimikālijas korozivitāti/kairinātspēju. Attiecībā uz esošajām ķimikālijām, par kurām nav pietiekamu datu, kas raksturo to korozīvo/kairinošo ietekmi uz ādu un acīm, šo stratēģiju var izmantot trūkstošo datu iegūšanai. Lēmums izmantot atšķirīgu testēšanas stratēģiju vai procedūru vai lēmums neveikt pakāpenisku testēšanu ir jāpamato.

IN VIVO TESTA PRINCIPS

Pēc pirmapstrādes ar sistēmisku analgētisko līdzekli un pienācīgas vietējās anestēzijas inducēšanas testējamo ķimikāliju vienā devā aplicē vienai no eksperimenta dzīvnieka acīm; neapstrādāto aci izmanto kontrolei. Acs koroziju/kairinājumu novērtē pēc konjunktīvas, radzenes un varavīksnenes bojājumu pakāpes noteiktos laika intervālos. Lai ietekmi novērtētu pilnīgi, apraksta arī citu veidu ietekmi uz aci, kā arī nelabvēlīgu sistēmisku ietekmi. Pētījumi jāveic tik ilgi, lai varētu novērtēt novērotās ietekmes atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu.

Dzīvnieki, kam kādā testa posmā ir stipru sāpju un/vai diskomforta pazīmes vai bojājumi, kuri sakrīt ar šajā testēšanas metodē aprakstītajiem humānajiem beigupunktiem (skatīt 26. punktu), humāni jānonāvē, un testējamā ķimikālija attiecīgi jānovērtē. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu humāni nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, ir sniegti ESAO norādījumu dokumentā

▼M7

SAGATAVOŠANĀS *IN VIVO* TESTAM

Sugas izvēle

Piemērotākais laboratorijas dzīvnieks ir albīnais trusis; izmanto jaunus, veselus pieaugušus dzīvniekus. Citu celmu [*strain*] vai sugu izmantošana jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

Katram provizoriski atlasītajam eksperimenta dzīvniekam ne vairāk kā 24 stundas pirms testa sākšanas pārbauda abas acis. Dzīvnieki ar acu kairinājuma pazīmēm, acu defektiem vai iepriekšējiem radzenes bojājumiem nav izmantojami.

Turēšanas un barošanas apstākļi

Dzīvnieki jātur atsevišķi. Telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, trušiem nepieciešama 20 °C (± 3 °C) temperatūra. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Jāizvairās no pārmērīgas gaismas intensitātes. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim.

TESTA PROCEDŪRA

Vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analgētisko līdzekļu lietošana

Lai acs drošības testēšanas procedūru laikā novērstu vai līdz minimumam samazinātu sāpes un diskomfortu, ieteicams izmantot turpmāk norādītās procedūras. Tās iespējams aizstāt ar citām procedūrām, ja ir noteikts, ka tās novērš vai atvieglo sāpes un diskomfortu tikpat labi vai vēl labāk.

— Sešdesmit minūtes pirms testējamās ķimikālijas aplicēšanas (*TCA*) ar zemādas injekciju ievada buprenorfīnu (0,01 mg/kg), lai nodrošinātu terapeitisku sistēmiskās atsāpināšanas līmeni. Nav zināms vai paredzams, ka buprenorfīns un citi līdzīgi analgētiskie līdzekļi opioīdi, kurus sistēmiski ievada, mainītu acs atbildreakciju (12).

— Piecas minūtes pirms *TCA* katrai acij aplicē vienu vai divus pilienus acu vietējās anestēzijas līdzekļa (piemēram, 0,5 % proksimetakaīna hidrohlorīda vai 0,5 % tetrakaīna hidrohlorīda). Lai neietekmētu pētījumu, ieteicams izmantot vietējās anestēzijas līdzekli, kura sastāvā nav konservantu. Tā katra dzīvnieka acs, kas nav apstrādāta ar testējamo ķimikāliju, bet ir apstrādāta ar vietējās anestēzijas līdzekli, kalpo kontroles nolūkiem. Ja paredzams, ka testējamā ķimikālija radīs būtiskas sāpes un diskomfortu, tai parasti nevajadzētu veikt *in vivo* testu. Tomēr šaubu gadījumā vai tad, ja testēšana ir vajadzīga, jāapsver papildu apstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli, kas pirms *TCA* jāveic ik pēc 5 minūtēm. Lietotājiem jāapzinās, ka vairākkārtēja apstrāde ar vietējās anestēzijas līdzekli varētu mazliet pasliktināt ķimikālijas izraisītos bojājumus un/vai pagarināt laiku, kas nepieciešams, lai tie izzustu.

— Astoņas stundas pēc *TCA* ar zemādas injekciju ievada buprenorfīnu — 0,01 mg/kg — SC un meloksikāmu — 0,5 mg/kg —, lai turpinātu nodrošināt terapeitisku sistēmiskās atsāpināšanas līmeni. Kaut arī nav datu, kas liecinātu, ka meloksikāmam ir pretiekaisuma ietekme uz aci, ja to reizi dienā ievada ar zemādas injekciju, meloksikāmu nevajadzētu ievadīt, kamēr nav apritējušas vismaz 8 stundas pēc *TCA*, lai pētījumu nekādi neietekmētu (12).

— Pēc sākotnējās 8 stundu ilgās apstrādes, ko veic pēc *TCA*, ar zemādas injekciju ik pēc 12 stundām jāievada buprenorfīns — 0,01 mg/kg — kopā ar meloksikāmu — 0,5 mg/kg —, ko ar zemādas injekciju ievada ik pēc 24 stundām, līdz acs bojājumi ir novērsti un nav novērojamas sāpju vai

▼M7

diskomforta klīniskās pazīmes. Ir pieejami ilgstošas iedarbības analgētiskie līdzekļi, kuru izmantošanu varētu apsvērt, lai samazinātu analgētisko līdzekļu devu biežumu.

— Ja ar preventīvo analgētisko līdzekli un vietējās anestēzijas līdzekli nepietiek, tūlīt pēc *TCA* jāaplicē analgētiskais "glābšanas" līdzeklis. Ja pētījuma laikā dzīvniekam novērojamas sāpju vai diskomforta pazīmes, ar zemādas injekciju nekavējoties ievada buprenorfīna "glābšanas" devu — 0,03 mg/kg —, ko vajadzības gadījumā atkārto pat ik pēc 8 stundām, nevis 0,01 mg/kg ar zemādas injekciju ik pēc 12 stundām. Ik pēc 24 stundām, bet ne agrāk kā vismaz 8 stundas pēc *TCA* kopā ar buprenorfīna "glābšanas" devu ar zemādas injekciju jāievada meloksikāms — 0,5 mg/kg.

Testējamās ķimikālijas ievadīšana

Testējamo ķimikāliju katram dzīvniekam ievada vienas acs konjunktīvas maisā, pirms tam apakšējo plakstiņu viegli pavelkot nost no acābola. Pēc tam plakstiņus apmēram vienu sekundi viegli tur kopā, lai viela neizplūstu. Otrā acs paliek neapstrādāta, un to izmanto kontroles nolūkos.

Skalošana

Testa dzīvniekiem acis nedrīkst skalot vismaz 24 stundas pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas, izņemot gadījumus, kad ievada cietvielas (skatīt 18. punktu), kā arī tad, kad novērojama tūlītēja kairinoša vai kodīga iedarbība. Pēc 24 stundām acis vajadzības gadījumā var izskalot.

Izņemot gadījumus, kad tas ir zinātniski pamatoti, nav ieteicams veikt pētījumus ar satelītgrupu, lai noskaidrotu skalošanas ietekmi. Ja satelītgrupa ir vajadzīga, jāizmanto divi truši. Precīzi jādokumentē skalošanas apstākļi, piemēram, skalošanas laiks, skalojamā šķīduma sastāvs un temperatūra; ilgums, tilpums un ātrums.

Devas līmenis

1) *Šķidrumu testēšana*

Šķidrumu testēšanai izmanto 0,1 ml devu. Ķimikālijas ievadīšanai tieši acī nedrīkst izmantot smidzinātājus. Pirms iepilināt acī 0,1 ml šķidra aerosola, tas vispirms jāizsmidzina un jāsavāc tvertnē.

2) *Cietvielu testēšana*

Testējot cietvielas, pastas un ķimikālijas daļiņu veidā, izmantojamajam daudzumam jābūt 0,1 ml pēc tilpuma vai ne vairāk kā 100 mg pēc masas. Testējamā ķimikālija jāsaberž smalkā pulverī. Cietu vielu tilpums jāmēra pēc to vieglas sablīvēšanas, piemēram, sakratot mērtrauku. Ja testējamā cietā ķimikālija līdz pirmajam novērojumu laikpunktam 1 stundu pēc ievadīšanas nav no testa dzīvnieka acs izvadīta ar fizioloģiskiem mehānismiem, aci var izskalot ar sālsūdeni vai destilētu ūdeni.

3) *Aerosolu testēšana*

Visas ar sūkni izsmidzināmās vielas un aerosolus pirms ievadīšanas acī ieteicams vispirms izsmidzināt un savākt tvertnē. Vienīgais izņēmums ir ķimikālijas aerosola baloniņos zem spiediena, kuras nav iespējams savākt tvertnē iztvaikošanas dēļ. Šādos gadījumos acs jātur atvērta un testējamā ķimikālija jāievada acī, to apmēram vienu sekundi izsmidzinot no 10 cm attāluma tieši uz acābola. Attālumu var mainīt atkarībā no spiediena aerosola baloniņā un tā satura. Jāraugās, lai acij bojājumus nenodarītu aerosola baloniņa spiediens. Atsevišķos gadījumos var būt vajadzīgs novērtēt iespējamos mehāniskos acs bojājumus, ko varētu radīt aerosola baloniņa spiediens.

▼M7

Ar aerosola balonu ievadīto devu var noteikt, testu imitējot šādi — ķimikāliju izsmidzina uz sverampapīra [*weighing paper*] caur truša acs lieluma atveri tieši pie papīra. Acī iesmidzināto devu aptuveni nosaka, izmērot papīra svara palielinājumu. Gaistošām ķimikālijām devu var noteikt, uztvērējtvertni nosverot pirms testējamās ķimikālijas izņemšanas un pēc tās.

Sākotnējais tests (acs kairinājuma/korozijas *in vivo* tests ar vienu dzīvnieku)

Stingri ieteicams *in vivo* testus sākt, izmantojot vienu dzīvnieku (sk. šīs testēšanas metodes papildinājumu "Vielas acu kairinājuma un kodīgās iedarbības secīgas testēšanas stratēģija"). Pirms tiek sākta apstiprinošā testa veikšana ar otro dzīvnieku, jābūt iespējai ar novērojumiem noteikt bojājumu smaguma pakāpi un atgriezeniskumu.

Ja pēc iepriekš aprakstītās procedūras iegūtie testa rezultāti liecina, ka ķimikālijai ir korozīva vai stipri kairinoša iedarbība uz acīm, tālāku acs kairinājuma testēšanu neveic.

Apstiprinājuma tests (acu kairinājuma *in vivo* tests ar papildu dzīvniekiem)

Ja korozīva vai stipri kairinoša iedarbība sākotnējā testā nav novērota, kairinošā iedarbība vai tās neesība jāapstiprina testos ar vienu vai diviem papildu dzīvniekiem. Ja sākotnējā testā ir novērojama kairinoša iedarbība, ieteicams apstiprinošo testu veikt secīgi, izmantojot pa vienam dzīvniekam, nevis vienlaikus izmantot divus papildu dzīvniekus. Ja otrajam dzīvniekam konstatē korozīvu vai stipri kairinošu iedarbību, testu neturpina. Ja no otrā dzīvnieka iegūtie rezultāti ir pietiekami, lai būtu iespējams ķimikāliju klasificēt pēc bīstamības, turpmāku testēšanu neveic.

Novērošanas periods

Novērojumi jāveic pietiekami ilgi, lai varētu pilnīgi novērtēt novērotās ietekmes intensitāti un atgriezeniskumu. Taču, ja dzīvniekiem parādās stipru sāpju vai diskomforta pazīmes (8), eksperiments vienmēr uzreiz jāpārtrauc. Lai noteiktu ietekmes atgriezeniskumu, dzīvnieki parasti jānovēro 21 dienu pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Ja iedarbības atgriezeniskumu konstatē, pirms ir beidzies 21 dienas periods, eksperimentu attiecīgi beidz ātrāk.

Klīniskie novērojumi un acs reakciju klasificēšana

Vienu stundu pēc *TCA* acis rūpīgi jāizmeklē attiecībā uz acs bojājumu esamību vai neesību; pēc tam izmeklēšanu veic vismaz reizi dienā. Pirmajās trīs dienās dzīvnieki jāizmeklē vairākas reizes dienā, lai nodrošinātu, ka lēmumi testu beigt tiek pieņemti savlaicīgi. Visa pētījuma laikā regulāri, vismaz divas reizes dienā ar vismaz 6 stundu intervālu starp novērojumiem vai vajadzības gadījumā biežāk, jāizvērtē, vai eksperimenta dzīvniekiem nav sāpju un/vai diskomforta klīnisko pazīmju (piemēram, atkārtota acs aizskaršana vai berzēšana ar ķepu, pārmērīga mirkšķināšana, pārmērīga asarošana) (9) (10) (11). Tas jādara, lai i) pienācīgi novērtētu dzīvnieku sāpju un diskomforta pazīmes un pieņemtu apzinātus lēmumus par nepieciešamību palielināt analgētisko līdzekļu devu un ii) novērtētu,

▼M7

vai dzīvniekiem nav iestājušās noteikto humāno beigupunktu pazīmes, un pieņemtu informētus lēmumus par to, vai dzīvnieki būtu humāni jāeitanazē, un nodrošinātu tādu lēmumu savlaicīgu pieņemšanu. Standarta kārtā jāizmanto iekrāsošana ar fluoresceīnu, un vajadzības gadījumā jālieto spraugas lampas biomikroskops (piemēram, novērtējot bojājuma dziļumu, ja novērojama radzenes ulcerācija), kas var palīdzēt detektēt un izmērīt acs bojājumus un ar ko novērtē, vai nav sasniegti noteiktie humānas eitanāzijas beigupunkta kritēriji. Novēroto bojājumu digitālās fotogrāfijas var apkopot kā atsauces materiālus un izmantot par pastāvīgu acs bojājuma apmēra liecību. Dzīvnieki testā nav jātur ilgāk par galīgas informācijas iegūšanai vajadzīgo laiku. Dzīvniekus ar stipru sāpju vai diskomforta pazīmēm nekavējoties humāni nonāvē, un testējamo ķimikāliju attiecīgi novērtē.

Humāni nonāvē dzīvniekus, kuriem pēc ķimikālijas iepilināšanas rodas šādi acs bojājumi (skatīt 1. tabulu ar bojājuma pakāpju aprakstiem): radzenes perforācija vai liela radzenes ulcerācija, tostarp stafiloma; asinis acābola priekšējā kamerā; 4. pakāpes radzenes aptumšošanās; nereaģēšana uz gaismu (2. pakāpes varavīksnenes reakcija) ilgāk nekā 72 stundas; konjunktīvas ulcerācija; konjunktīvas vai mirkšķināšanas membrānas nekroze; vai nekrotisko audu lobīšanās. Tā rīkojas tāpēc, ka šādi bojājumi parasti ir neatgriezeniski. Turklāt ieteicams minētos acs bojājumus izmantot par humānajiem beigupunktiem pētījumu pārtraukšanai pirms 21 dienas novērošanas perioda beigām. Tiek uzskatīts, ka šie bojājumi liecina par smagiem kairinošiem vai korozīviem bojājumiem un tādiem bojājumiem, kuru izzušana līdz 21 dienas novērošanas perioda beigām ir maz ticama: ļoti dziļš bojājums (piem., radzenes ulcerācija pārsniedz stromas virsējos slāņus), > 50 % radzenes malas zaudējums (par ko liecina konjunktīvas audu izbalēšana) un smaga acs infekcija (strutaini izdalījumi). Radzenes virsmas vaskularizācija (t. i., pannuss); ar fluoresceīnu iekrāsotās daļas nemazināšanās, kas konstatēta ikdienas novērtēšanā; un/vai tas, ka 5 dienas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas nenotiek reepitelizācija, — arī šo pazīmju kombināciju var uzskatīt par potenciāli lietderīgiem kritērijiem, kas var pamudināt pieņemt klīnisku lēmumu pētījumu priekšlaicīgi izbeigt. Tomēr katrs no šiem konstatējumiem atsevišķi nav pietiekams iemesls pētījuma priekšlaicīgai izbeigšanai. Līdzko ir konstatēta smaga ietekme uz acīm, jākonsultējas ar laboratorijas dzīvnieku ārstējošo ārstu, kvalificētu veterinārārstu vai darbinieku, kurš ir apmācīts klīnisko bojājumu identificēšanā, lai noteiktu, vai šādas ietekmes kopā dod pamatu pētījumu izbeigt priekšlaicīgi. Acs (konjunktīvas, radzenes, varavīksnenes) reakcijas pakāpes nosaka un reģistrē 1, 24, 48 un 72 stundas pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas (1. tabula). Dzīvniekiem, kuriem acs bojājumi neveidojas, pētījumu var izbeigt ne agrāk kā 3 dienas pēc ķimikālijas iepilināšanas. Dzīvnieki ar acs bojājumiem, kas nav smagi, jānovēro, līdz bojājumi izzūd, vai 21 dienu periodu, pēc kura apritēšanas pētījumu izbeidz. Novērojumi jāveic un jāreģistrē vismaz 1 stundu, 24 stundas, 48 stundas, 72 stundas, 7 dienas, 14 dienas un 21 dienu, lai novērtētu bojājumu stāvokli un to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Ja nepieciešams, jāveic biežāki novērojumi, lai noteiktu, vai eksperimenta dzīvniekiem humānu apsvērumu dēļ nav jāveic eitanāzija vai tie nav jāizņem no pētījuma negatīvu rezultātu dēļ.

Pēc katras apskates jāreģistrē acs bojājumu pakāpe (1. tabula). Reģistrē arī visus pārējos acs bojājumus (piem., pannusu, iekrāsošanos, izmaiņas acābola priekšējā kamerā) un nelabvēlīgu sistēmisku ietekmi.

Atbildreakciju izvērtēšanai var izmantot binokulāro lupu, pārnēsājamu spraugas lampu, biomikroskopu vai citas piemērotas ierīces. Kad reģistrēti novērojumi pēc 24 stundām, turpmākām acu pārbaudēm var izmantot fluoresceīnu.

Acs atbildreakciju klasifikācija ir neizbēgami subjektīva. Lai veicinātu acs atbildreakciju klasifikācijas saskaņošanu un palīdzētu testēšanas laboratorijām, kā arī novērojumu veicējiem un interpretētājiem, personālam, kas veic novērojumus, jābūt pietiekami apmācītam par izmantojamo klasifikācijas sistēmu.

▼M7

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izvērtējums

Acu kairinājuma rādītāji jānovērtē, ņemot vērā bojājumu raksturu un smagumu, to atgriezeniskumu vai neatgriezeniskumu. Atsevišķie rādītāji nav uzskatāmi par ķimikālijas kairinošo īpašību absolūtu standartu, jo tiek novērtēta arī cita testējamās ķimikālijas ietekme. Tāpēc atsevišķie rādītāji jāuzskata par atsauces vērtībām un tiem ir nozīme tikai tad, ja tie tiek pamatoti ar pilnīgiem aprakstiem un visu novērojumu izvērtējumu.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

In vivo testa veikšanas pamatojums: iepriekš veikto testu datu, tostarp pēc secīgās testēšanas stratēģijas iegūto rezultātu, analīze pēc pierādījumu svara:

— relevantu iepriekš veiktajos testos iegūto datu apraksts,

— katrā testēšanas stratēģijas posmā iegūtie dati,

— veikto *in vitro* testu apraksts, tostarp sīkas ziņas par izmantotajām procedūrām, rezultātiem, kas iegūti ar testējamajām/standarta ķimikālijām,

— veikto *in vivo* ādas kairinājuma/korozijas pētījumu apraksti, tostarp iegūtie rezultāti,

— *in vivo* pētījumam nepieciešamā pierādījumu svara analīze.

Testējamā ķimikālija:

— identifikācijas dati (piem., ķīmiskais nosaukums un *CAS* numurs (ja ir), tīrība, zināmie piemaisījumi, avots, sērijas numurs),

— fizikālās un fizikālķīmiskās īpašības (piem., pH, gaistamība, šķīdība, stabilitāte, spēja reaģēt ar ūdeni),

— maisījumam: komponenti jāidentificē, norādot identifikācijas datus par to sastāvā esošajām vielām (piem., ķīmiskie nosaukumi un *CAS* numuri (ja ir)) un to koncentrācijas,

— aplicētās devas lielums.

Nesējs:

— identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums,

— nesēja izvēles pamatojums.

Testa dzīvnieki:

— izmantotais celms/līnija, izvēles pamatojums gadījumos, kad neizmanto albīnos trušus,

— katra dzīvnieka vecums pētījuma sākumā,

— katra dzimuma dzīvnieku skaits testa un kontroles grupās (ja vajadzīgs),

— katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.

▼M7

Anestēzijas līdzekļi un analgētiskie līdzekļi:

— vietējās anestēzijas līdzekļu un sistēmisko analgētisko līdzekļu ievadīšanas devas un laiki,

— ja izmantots vietējās anestēzijas līdzeklis, tā identifikācija, tīrība, veids un iespējamā mijiedarbība ar testējamo ķimikāliju.

Rezultāti:

— visos novērojumu laikos kairinājuma novērtēšanai izmantoto metožu apraksts (piemēram, pārnēsājamā spraugas lampa, biomikroskops, fluoresceīns),

— tabulā apkopoti kairinājuma/korozijas dati par katru dzīvnieku katrā novērošanas laikā līdz attiecīgā dzīvnieka izņemšanai no testa,

— novērotā kairinājuma un korozijas pakāpes un rakstura apraksts,

— citu novēroto acs bojājumu apraksts (piemēram, vaskularizācija, pannusa veidošanās, saaugumi, iekrāsošanās),

— ar aci nesaistītas nelabvēlīgas vietējas vai sistēmiskas ietekmes apraksts, sāpju un diskomforta klīnisko pazīmju pieraksts, digitālās fotogrāfijas un histopatoloģisko izmeklējumu rezultāti, ja tie veikti.

Rezultātu apspriešana

Rezultātu interpretācija

Laboratorijas dzīvnieku acu kairinājuma pētījumu rezultātus ekstrapolēt uz cilvēkiem ir pamatoti tikai līdz zināmai pakāpei. Daudzos gadījumos albīnie truši pret acīm korozīvām vai kairinošām vielām ir jutīgāki nekā cilvēki.

Interpretējot datus, jāraugās, lai tiktu izslēgts kairinājums, ko radījusi sekundāra infekcija.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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) Šā pielikuma B.4. nodaļa *"Akūts ādas kairinājums/korozija"*.

▼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 Publications, 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) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".

(14) Šā pielikuma B.40.a. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: cilvēka ādas modeļa tests".

(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) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".

(17) Šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".

(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), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) EK (2008), Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006. *Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis* L353, 1-1355.

(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

1. tabula

Acs bojājumu klasifikācija

Radzene	Pakāpe
Apduļķojums – blīvuma pakāpe (nolasījumi jāveic visblīvākajā zonā) (*)	
Ne ulcerācijas, ne apduļķojuma nav	0
Izkaisītas vai difūzas apduļķojuma zonas (izņemot normāla spīduma vieglu blāvumu);varavīksnenes daļas labi saskatāmas	1
Caurspīdīgā daļa viegli izšķirama; varavīksnenes daļas redzamas nedaudz neskaidri	2
Perlamutra zona; varavīksnenes daļas nav redzamas; acs zīlītes izmērs tikko redzams	3
Radzene necaurredzama; varavīksnene cauri apduļķojumam nav samanāma	4
Maksimāli iespējamie: 4	
Varavīksnene	
Norma	0
Krokas redzami padziļinātas, aizsprostojums, pietūkums, mērena apradzenes hiperēmija;vai asinsizplūdums; varavīksnene reaģē uz gaismu (par reakciju uzskata arī lēnu reakciju)	1
Asiņošana, vispārējs bojājums vai nav reakcijas uz gaismu	2
Maksimāli iespējamie: 2	
Konjunktīva	
Apsārtums (attiecas uz plakstiņu un acābola konjunktīvu, bet ne uz radzeni un varavīksneni)	
Norma	0
Daži asinsvadi izteikti hiperēmiski (piepildīti)	1
Difūza, tumšsarkana krāsa; atsevišķi asinsvadi grūti izšķirami	2
Difūza tumšsarkana liellopu gaļas krāsa	3
Maksimāli iespējamie: 3	
Hemoze	
Pietūkums (attiecas uz plakstiņiem un/vai mirkšķināšanas membrānām)	
Norma	0
Neliels pietūkums virs normas	1
Acīmredzams pietūkums ar plakstiņu daļēju izgriešanos	2
Pietūkums, plakstiņi apmēram pusaizvērti	3
Pietūkums, plakstiņi vairāk nekā pusaizvērti	4
Maksimāli iespējamie: 4	

(*) Jānorāda radzenes apduļķojuma platība.

▼**M7**

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Skābju/sārmu rezerve: skābiem preparātiem — nātrija hidroksīda daudzums (g) uz 100 g preparāta, kas nepieciešams, lai panāktu konkrētu pH; sārmainiem preparātiem — nātrija hidroksīda daudzums (g), kas ir līdzvērtīgs sērskābes daudzumam gramos uz 100 g preparāta, kurš nepieciešams, lai panāktu konkrētu pH (Young *et al*., 1988).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Kairinājumu neizraisošas vielas: vielas, kas nav klasificētas kā *EPA* I, II vai III kategorijas acu kairinājumu izraisītājas vai *GHS* 1., 2., 2.A vai 2.B kategorijas vai ES 1. vai 2. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Acu korozijas izraisītājs: a) ķimikālija, kas rada acs audu neatgriezenisku bojājumu; b) ķimikālijas, kas klasificētas kā *GHS* 1. kategorijas, *EPA* I kategorijas vai ES 1. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas acī izraisa atgriezeniskas izmaiņas; b) ķimikālijas, kas klasificētas kā *EPA* II vai III kategorijas, *GHS* 2., 2.A vai 2.B kategorijas vai ES 2. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Nopietna acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas izraisa acs audu bojājumus, kas neizzūd 21 dienas laikā pēc aplicēšanas vai kas izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos; b) ķimikālijas, kas tiek klasificētas kā *GHS* 1. kategorijas, *EPA* I kategorijas vai ES 1. kategorijas acu kairinājumu izraisītājas (17) (18) (19).

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas pieeja: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Pierādījumu izsvēršana (process): izsverot informācijas kopuma stiprās un vājās puses, nonāk pie secinājuma, pie kāda ne vienmēr ļauj nonākt atsevišķa datu daļa. kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

▼M7

TESTĒŠANAS METODES B.5. PAPILDINĀJUMS ([1])

SECĪGĀS TESTĒŠANAS STRATĒĢIJA ACU KAIRINĀJUMA UN KOROZIJAS NOTEIKŠANAI

Vispārīgi apsvērumi

Ņemot vērā gan zinātnisko rezultātu uzticamības, gan dzīvnieku labturības apsvērumus, ir svarīgi izvairīties no nevajadzīgiem testiem ar dzīvniekiem un pēc iespējas mazāk izmantot testus, kas varētu dzīvniekos izraisīt spēcīgu atbildreakciju. Pirms *in vivo* testēšanas jāizvērtē visa informācija, kas attiecas uz ķimikālijas potenciālo kairinātspēju/korozivitāti acīm. Var gadīties, ka jau ir pieejami pietiekami pierādījumi, lai testējamo ķimikāliju attiecībā uz tās spēju izraisīt acu kairinājumu/koroziju klasificētu, neveicot testus ar laboratorijas dzīvniekiem. Tā, izmantojot pierādījumu svara analīzi un secīgās testēšanas stratēģiju, var līdz minimumam samazināt vajadzību veikt *in vivo* testus, īpaši tad, ja ķimikālija var izraisīt spēcīgu reakciju.

Ieteicams ar pierādījumu svara analīzi izvērtēt esošo informāciju par ķimikāliju kairinošo un korozīvo ietekmi uz acīm un noteikt, vai šīs ietekmes raksturošanai varētu būt jāveic papildu pētījumi, kas nav *in vivo* pētījumi. Ja vajadzīgi papildu pētījumi, attiecīgo eksperimentālo datu iegūšanai ieteicams izmantot secīgās testēšanas stratēģiju. Ja viela nav testēta, tās korozīvās/kairinošās ietekmes uz acīm novērtēšanai nepieciešamo datu iegūšanai jāizmanto secīgās testēšanas stratēģija. Šajā papildinājumā aprakstītā sākotnējā testēšanas stratēģija tika izstrādāta ESAO darbseminārā (1). Pēc tam tā tika apstiprināta un paplašināta Saskaņotajā sistēmā ķīmisko vielu radīto cilvēka veselības un vides apdraudējumu integrētai klasificēšanai, kas atbalstīta Ķimikāliju komitejas un Ķimikāliju darba grupas 28. kopīgajā sanāksmē 1998. gada novembrī (2), un atjaunināta ESAO ekspertu grupā 2011. gadā.

Lai gan šī testēšanas stratēģija nav B.5. testēšanas metodes sastāvdaļa, tajā norādīta ieteicamā pieeja, kā nosakāma spēja izraisīt acu kairinājumu/koroziju. Šī pieeja ir gan acu kairinājuma/korozijas *in vivo* testēšanas paraugprakse, gan ētiskais etalons. Šajā testēšanas metodē sniegti norādījumi par *in vivo* testu veikšanu un apkopoti faktori, kas jāņem vērā pirms šāda testa apsvēršanas. Secīgās testēšanas stratēģijā sniegta pierādījumu izsvēršanas pieeja, ar kuru izvērtējami esošie dati par ķimikāliju kairinošo/korozīvo ietekmi uz acīm, un daudzpakāpju pieeja, ar ko iegūstami attiecīgie dati par ķimikālijām, par kurām vajadzīgi papildu pētījumi, vai par ķimikālijām, par kurām pētījumu nav vispār. Stratēģijā vispirms paredzēta validētu un vispārpieņemtu *in vitro* vai *ex vivo* testu veikšana un pēc tam — konkrētos apstākļos — testēšanas metodes B.4. pētījumi (3) (4).

Pakāpeniskās testēšanas stratēģijas apraksts

Pirms veikt testus, kas ir secīgās testēšanas stratēģijas daļa (attēlā), jāizvērtē visa pieejamā informācija, lai noteiktu nepieciešamību veikt *in vivo* acu testus. Lai gan būtisku informāciju var iegūt, izvērtējot atsevišķus rādītājus (piemēram, stipri augsts vai zems pH), jāņem vērā viss esošās informācijas kopums. Pieņemot

([1]) Integrētas testēšanas stratēģijas izmantošanai attiecībā uz acs kairinājumu saskaņā ar *REACH* regulu sk. arī *ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment* R.7.a nodaļu "Endpoint specific guidance" http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

▼M7

lēmumu par pierādījumu svaru, jāizvērtē visi relevantie dati par konkrētās ķimikālijas un tās strukturālo analogu iedarbību, un jāsniedz šā lēmuma pamatojums. Galvenais uzsvars jāliek uz esošajiem datiem par ķimikālijas iedarbību uz cilvēka organismu un uz dzīvniekiem un pēc tam uz *in vitro* vai *ex vivo* testu rezultātiem. Ja iespējams, jāvairās veikt korozīvu ķimikāliju *in vivo* pētījumus. Testēšanas stratēģijā ņemti vērā šādi faktori.

Jāizvērtē esošie dati par ietekmi uz cilvēka organismu un/vai dzīvniekiem un/vai *in vitro* dati, kas iegūti ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm (1. posms).

Vispirms jāizvērtē esošie dati par ietekmi uz cilvēka organismu, piem., klīniskie pētījumi vai arodekspozīcijas pētījumi un slimības vēstures un/vai testa dati no pētījumiem ar dzīvniekiem par ietekmi uz acīm, un/vai *in vitro* dati, kas iegūti ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm par acu kairinājumu/koroziju, jo tie sniedz informāciju, kas tieši saistīta ar ietekmi uz acīm. Pēc tam jāizvērtē pieejamie dati no pētījumiem ar cilvēkiem un/vai dzīvniekiem, kuros pētīta ādas korozija/kairinājums, un/vai no *in vitro* pētījumiem, kas veikti saskaņā ar validētām un starptautiski vispārpieņemtām ādas korozijas pētīšanas metodēm. Dzīvniekiem acīs nedrīkst pilināt ne ķimikālijas, par kurām zināms, ka tām ir korozīva vai stipri kairinoša ietekme uz acīm, ne ķimikālijas, kurām ir korozīva vai stipri kairinoša ietekme uz ādu; jāuzskata, ka tām būs korozīva un/vai kairinoša ietekme arī uz acīm. Tāpat *in vivo* pētījumos nevajadzētu testēt arī ķimikālijas, par kurām iepriekš veiktajos pētījumos par ietekmi uz acīm iegūti pietiekami zinātniskie dati, kas apliecina, ka tās nav ne korozīvas, ne kairinošas.

Struktūras un aktivitātes sakarību (*SAR*) analīze (2. posms).

Jāņem vērā strukturāli radniecīgu ķimikāliju testu rezultāti, ja tie ir pieejami. Ja pētījumos ar cilvēkiem un/vai dzīvniekiem iegūts pietiekami daudz datu par strukturāli radniecīgu vielu vai šādu vielu maisījumu potenciālu atstāt korozīvu/kairinošu ietekmi uz acīm, var pieņemt, ka testējamā ķimikālija izraisīs tādas pašas atbildreakcijas. Šādos gadījumos veikt testus ar šo ķimikāliju var nebūt vajadzīgs. Negatīvi dati no pētījumiem par strukturāli radniecīgām vielām vai šādu vielu maisījumiem nav uzskatāmi par pietiekamu pierādījumu, ka ķimikālija nebūs korozīva vai kairinoša, secīgas testēšanas stratēģijā. Lai konstatētu ķimikālijas potenciālu atstāt korozīvu vai kairinošu ietekmi uz ādu un acīm, jāizmanto validēta un vispārpieņemta pieeja *SAR* analīzei.

Fizikālķīmiskās īpašības un ķīmiskā reaģētspēja (3. posms).

Ķimikālijām ar ļoti zemu vai augstu pH, piemēram, $\leq$ 2,0 vai $\geq$ 11,5, var būt spēcīga lokāla ietekme. Ja ķimikālija ir identificēta par acīm korozīvu vai kairinošu, pamatojoties uz ļoti augstu vai zemu pH, var ņemt arī vērā tās skābju/sārmu rezervi (buferkapacitāti) (5) (6) (7). Ja buferkapacitāte liecina, ka ķimikālija varētu nebūt korozīva acīm (t. i., ķimikālijas ar ļoti augstu vai zemu pH un zemu skābju/sārmu rezervi), jāveic papildu testēšana, lai par to pārliecinātos, vēlams, izmantojot validētu un vispārpieņemtu *in vitro* vai *ex vivo* testu (sk. 10. punktu).

Jāizskata cita pieejamā informācija (4. posms).

Šajā posmā jāizvērtē visa pieejamā informācija par sistēmisko toksiskumu pie uzņemšanas dermālā ceļā. Jāizskata arī testējamās ķimikālijas akūtais dermālais toksiskums. Ja pierādīts, ka testējamai ķimikālijai ir stipri toksiska ietekme pie

▼M7

uzņemšanas dermālā ceļā, iespējams, ka testēt tās ietekmi uz acīm var nebūt vajadzīgs. Lai gan akūts dermāls toksiskums ne vienmēr ir tieši saistāms ar kairinošu/korozīvu ietekmi uz acīm, var pieņemt, ka gadījumos, kad viela, uzņemta dermālā ceļā, ir stipri toksiska, tā būs ļoti toksiska arī tad, ja to iepilinās acī. Šādus datus var apsvērt arī starp 2. un 3. posmu.

Ja tas nepieciešams normatīviem mērķiem, jānovērtē arī ķimikālijas dermālā korozivitāte (5. posms).

Ādas korozijas un nopietna kairinājuma potenciāls vispirms jāizvērtē saskaņā ar testēšanas metodi B.4. (4) un pievienoto papildinājumu (8), izmantojot arī validētas un starptautiski vispārpieņemtas *in vitro* testēšanas metodes ādas korozijas noteikšanai (9) (10) (11). Ja tiek novērots, ka ķimikālijai ir korozīva iedarbība uz ādu vai tā rada spēcīgu ādas kairinājumu, var uzskatīt, ka tā ir korozīva vai stipri kairinoša arī acīm. Līdz ar to nav jāveic turpmāki testi. Ja ķimikālijai nav korozīvas iedarbības uz ādu vai tā nerada spēcīgu ādas kairinājumu, jāveic *in vitro* vai *ex vivo* tests par tās ietekmi uz acīm.

In vitro vai *ex vivo* testu rezultāti (6. posms).

Ķimikālijas, kurām konstatēta korozīva vai stipri kairinoša ietekme *in vitro* vai *ex vivo* testos (12) (13), kas ir validēti un starptautiski vispārpieņemti tieši acu korozijas/kairinājuma novērtēšanai, nav jāpārbauda testos ar dzīvniekiem. Var uzskatīt, ka šādām ķimikālijām būs līdzvērtīga spēcīga ietekme arī *in vivo*. Ja validēti un vispārpieņemti *in vitro*/*ex vivo* testi nav pieejami, 6. posmu izlaiž un pāriet pie 7. posma.

In vivo tests ar trušiem (7. un 8. posms).

In vivo testi uz acīm jāsāk ar sākotnēju testu, kuram izmanto vienu dzīvnieku. Ja tā rezultāti liecina, ka ķimikālijai ir stipri kairinoša vai korozīva ietekme uz acīm, turpmāku testēšanu neveic. Ja šajā testā nekāda korozīva vai kairinoša ietekme konstatēta netiek, jāveic apstiprināšanas tests ar vēl diviem dzīvniekiem. Atkarībā no apstiprinājuma testa rezultātiem var būt nepieciešami papildu testi [sk. testēšanas metodi B.5].

▼M7

ACU KAIRINĀJUMA/KOROZIJAS TESTĒŠANAS UN NOVĒRTĒŠANAS STRATĒĢIJA

	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
1.	Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai *in vitro* datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz ietekmi uz acīm	Smagi acu bojājumi	Apikālais beigupunkts; uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
		Acīm kairinoša	Apikālais beigupunkts; uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga.
		Nav acīm korozīva/kairinoša	Apikālais beigupunkts; uzskata, ka nav acīm korozīva vai kairinoša. Testēšana nav nepieciešama
	Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai *in vitro* datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz korozīvu ietekmi uz ādu	Korozīva ietekme uz ādu	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
	Izskata esošos datus par ietekmi uz cilvēkiem un/vai dzīvniekiem un/vai *in vitro* datus no validētām un starptautiski vispārpieņemtām metodēm attiecībā uz stipri kairinošu ietekmi uz ādu	Spēcīgs ādas kairinātājs	Uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Informācijas nav vai esošā informācija neļauj izdarīt pārliecinošus secinājumus		
	↓		
2.	Veic *SAR* attiecībā uz acs koroziju/kairinājumu	Paredzami smagi acu bojājumi	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
		Paredzams acu kairinājums	Uzskata par acīm kairinošu. Testēšana nav vajadzīga.
	Apsver iespēju veikt *SAR* attiecībā uz ādas koroziju	Paredzama ādas korozija	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Nav iespējams izdarīt prognozes vai arī prognozes nav pārliecinošas vai ir negatīvas		
	↓		
3.	Veic pH mērījumus (attiecīgā gadījumā nosaka buferkapacitāti)	pH ≤ 2 vai 11,5 (un attiecīgā gadījumā augsta buferkapacitāte)	Uzskata par acīm korozīvu. Testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	2 < pH < 11,5 vai pH ≤ 2,0 vai 11,5, attiecīgā gadījumā — ar nelielu buferkapacitāti vai bez tās		
	↓		
4.	Izskata esošos datus par sistēmisko toksicitāti pie uzņemšanas dermālā ceļā.	Koncentrācijās, kādas tiktu testētas uz acīm, stipri toksiska.	Ķimikālija ir pārāk toksiska, lai ar to veiktu testus. Testēšana nav vajadzīga.

▼M7

	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
	↓		
	Šādas informācijas nav vai ķimikālija nav ļoti toksiska		
	↓		
5.	Eksperimentā novērtē ādas korozijas potenciālu saskaņā ar šā pielikuma B.4. nodaļā paredzēto testēšanas stratēģiju, ja tas nepieciešams arī normatīviem mērķiem.	Korozijas vai stipra kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm korozīvu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Ķimikālijai nav korozīvas vai stipri kairinošas ietekmes uz ādu.		
	↓		
6.	Veic validētu(-s) un vispārpieņemtu(-s) *in vitro* vai *ex vivo* testu(-s) acīm.	Korozijas vai stipra kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm korozīvu / stipri kairinošu, ja ar veikto testu var identificēt korozijas / spēcīga kairinājuma izraisītājus un ķimikālija ir testa izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Kairinājuma atbildreakcija.	Uzskata par acīm kairinošu, ja veikto(-s) testu(-s) var izmantot, lai pareizi identificētu korozijas / spēcīga kairinājuma izraisītājus un kairinātājus, un ķimikālija ir testa(-u) izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Kairinājuma atbildreakcija nav konstatēta.	Uzskata, ka acīm nav kairinoša, ja veikto(-s) testu(-s) var izmantot, lai pareizi identificētu kairinājuma neizraisītājus, tos pareizi nošķirtu no ķimikālijām, kuras ir kairinošas, stipri kairinošas vai korozīvas acīm, un ķimikālija ir testa izmantojamības jomā. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Secinājumu izdarīšanai nevar izmantot validētu(-s) un vispārpieņemtu(-s) in vitro vai ex vivo testu(-s) acīm		
	↓		

▼M7

	Darbība	Konstatējums	Secinājumi
7.	Veic sākotnēju truša acu *in vivo* testu ar vienu dzīvnieku.	Smagi acu bojājumi.	Uzskata par acīm korozīvu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
	↓		
	Nav smagu bojājumu vai nav atbildreakcijas		
	↓		
8.	Veic apstiprināšanas testu ar vienu vai diviem papildu dzīvniekiem.	Korozīva vai kairinoša.	Uzskata par acīm korozīvu vai kairinošu. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.
		Nav korozīva vai kairinoša.	Uzskata, ka nav acīm korozīva vai kairinoša. Turpmāka testēšana nav vajadzīga.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 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://www.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) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".

(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., Edsail, 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. Toxicology *in vitro* 12, pp.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) Šā pielikuma B.4. nodaļas papildinājums "Ādas kairinājuma un korozijas secīgās testēšanas stratēģija".

(9) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro:* transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".

(10) Šā pielikuma B.40bis. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: cilvēka ādas modeļa tests".

(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) Šā pielikuma B.47. nodaļa *"Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode acu koroziju vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai"*.

(13) ESAO (2009b), šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode acu koroziju vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai".

▼B

B.6. ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Piezīmes

Testu jutīgumu un to spēju noteikt potenciālos cilvēku ādas sensibilizatorus uzskata par svarīgu klasifikācijas sistēmā, kas attiecas uz sabiedrības veselības aizsardzību.

Nav vienas testa metodes, kas adekvāti identificētu visas cilvēku ādu potenciāli sensibilizējošas vielas un kas attiektos uz visām vielām.

Izvēloties testu, ir jāņem vērā tādi faktori kā vielas fizikālās īpašības, iekļaujot tās spēju iekļūt ādā.

Ir izveidoti divi testu tipi, kuros izmanto jūrascūciņas: testi ar adjuvantiem, kuros alerģisko stāvokli veicina, izšķīdinot vai suspendējot testa vielu Freinda pilnajā adjuvantā (FCA), un testi bez adjuvantiem.

Testi ar adjuvantiem parasti precīzāk paredz vielas iespējamo sensibilizējošo ietekmi uz cilvēku nekā metodes, kas neizmanto Freinda pilno adjuvantu, un tādēļ tie ir ieteicamākie testi.

Maksimizācijas tests jūrascūciņām (GPMT) ir plaši lietojams tests ar adjuvantiem. Kaut arī, lai noteiktu vielas spēju izraisīt ādas sensibilizācijas reakciju, var izmantot vairākas citas metodes, par ieteicamāko metodi ar adjuvantiem uzskata GPMT.

Daudzām ķīmisko vielu klasēm testus bez adjuvantiem (ieteicamākais no tiem ir Bīlera tests) uzskata par mazāk jutīgiem.

Dažos gadījumos var būt pamatoti iemesli izvēlēties Bīlera testu, kas saistīts ar pielietošanu uz ādas, nevis ar intradermālu injekciju, kuru izmanto jūrascūciņu maksimizācijas testā. Ja izmanto Bīlera testu, ir jāsniedz zinātnisks pamatojums.

Jūrascūciņu maksimizācijas tests (GPMT) un Bīlera tests ir aprakstīts šajā metodē. Var izmantot citas metodes ar nosacījumu, ka tās ir labi novērtētas un ir dots zinātnisks pamatojums.

Ja atzītā skrīninga testā ir redzams pozitīvs rezultāts, testa vielu var apzīmēt kā potenciālu sensibilizatoru, un turpmāka testa ar jūrascūciņām izdarīšana var nebūt vajadzīga. Tomēr, ja šādā testā ir redzams negatīvs rezultāts, tests ar jūrascūciņām, izmantojot šajā testa metodē aprakstīto procedūru, ir jāizdara.

Skatīt arī vispārējā ievada B daļu.

▼B

1.2. DEFINĪCIJAS

Ādas sensibilizācija: (alerģiskais kontaktdermatīts) ir imunoloģiski nosacīta ādas reakcija uz vielu. Cilvēka atbildes reakcijas var raksturot nieze, apsārtums, uztūkums, mezgliņi, pūslīši, tulznas vai to apvienojums. Citu sugu atbildes reakcijas var atšķirties, un var būt redzams tikai apsārtums un uztūkums.

Pakļaušana inducējošai iedarbībai: pētījuma objekta eksperimentāla pakļaušana testa vielas iedarbībai, lai inducētu hiperjutības stāvokli.

Indukcijas laikposms: vismaz vienu nedēļu ilgs laikposms pēc pakļaušanas inducējošai iedarbībai, kura laikā var izveidoties hiperjutības stāvoklis.

Provokatīvais mijiedarbības tests iepriekš apstrādāta pētījumu objekta eksperimentāla pakļaušana testa vielas iedarbībai pēc indukcijas laika posma, lai noteiktu, ka pētījumu objekts reaģē hiperjutīgi.

1.3. STANDARTVIELAS

Lietotās eksperimenta metodes jutība un ticamība ir jānovērtē reizi sešos mēnešos, izmantojot vielas, par kurām ir zināms, ka tām ir vieglas līdz vidējas ādu sensibilizējošas īpašības.

Pareizi izdarītā testā viegliem/vidējiem sensibilizatoriem ir sagaidāma vismaz 30 % atbildes reakcija testā ar adjuvantiem un vismaz 15 % testā bez adjuvantiem.

Priekšroka ir dodama šādām vielām:

CAS numurs	*Einecs* numurs	*Einecs* nosaukums	Parastais nosaukums
101-86-0	202-983-3	α-heksilkanelaldehīds	α-heksilkanelaldehīds
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiols (merkaptobenzotiazols)	kaptakss
94-09-7	202-303-5	benzokaīns	nordkaīns

Var būt apstākļi, kad ar pienācīgu pamatojumu var izmantot citas kontroles vielas, kas atbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Testa dzīvniekus sākotnēji pakļauj testa vielas iedarbībai, izmantojot intradermālas injekcijas un/vai pielietojot epidermāli (pakļaušana inducējošai iedarbībai). Pēc 10 līdz 14 dienu miera laikposma (indukcijas laikposms), kura laikā var izveidoties imūnreakcija, dzīvniekus pakļauj provokatīvās devas iedarbībai. Testa dzīvnieku ādas reakcijas apmēru un pakāpi provokatīvajā mijiedarbības testā salīdzina ar to, ko uzrāda kontrolgrupas dzīvnieki, kuriem indukcijas laikā izdarīts tukšais mēģinājums, un iegūst provokatīvo iedarbību.

1.5. TESTA METOŽU APRAKSTS

Ja testa vielas noņemšanu uzskata par vajadzīgu, tas jāsasniedz, izmantojot ūdeni vai piemērotu šķīdinātāju, nemainot esošo atbildes reakciju vai epidermas veselumu.

▼B

1.5.1. *Jūrascūciņu maksimizācijas tests (GPMT)*

1.5.1.1. Sagatavošanās

Veselas, jaunas, pieaugušas albīnas jūrascūciņas vismaz piecas dienas pirms testa aklimatizē laboratorijas apstākļos. Pirms testa dzīvniekus izvēlas pēc nejaušās izvēles principa un iedala vielas ievadīšanas un kontroles grupās. Apmatojumu noņem cērpot, skujot vai varbūt ar ķīmisko depilāciju atkarībā no izmantotās testa metodes. Jāpievērš vērība, lai nenobrāztu ādu. Dzīvniekus nosver pirms testa uzsākšanas un testa beigās.

1.5.1.2. Testa apstākļi

1.5.1.2.1. Testa dzīvnieki

Izmanto parasti izmantojamās albīno jūrascūciņu laboratorijas līnijas.

1.5.1.2.2. Skaits un dzimums

Var izmantot vīriešu un/vai sieviešu dzimuma dzīvniekus. Ja izmanto mātītes, tām jābūt nedzemdējušām un negrūsnām.

Vielas ievadīšanas grupā izmanto vismaz 10 dzīvniekus un kontrolgrupā vismaz 5 dzīvniekus. Ja izmanto mazāk nekā 20 testa un mazāk nekā 10 kontroles jūrascūciņas un ja nav iespējams secināt, ka testa viela ir sensibilizators, ir noteikti ieteicama papildu dzīvnieku testēšana, lai kopā būtu vismaz 20 testa dzīvnieki un 10 kontroles dzīvnieki.

1.5.1.2.3. Devu līmeņi

Katrā pakļaušanā induktīvai iedarbībai testa vielas koncentrācijai jābūt dzīvnieka organismam sistēmiski labi panesamai un tai jābūt lielākajai, kas rada vieglu līdz vidēju ādas kairinājumu. Provokatīvajā mijiedarbības testā izmantotajai koncentrācijai jābūt lielākajai devai, kas kairinājumu nerada. Vajadzības gadījumā atbilstīgās koncentrācijas var noteikt ievadpētījumā, kurā izmanto divus vai trīs dzīvniekus. Jāņem vērā, ka šajā nolūkā jāizmanto dzīvnieki, kas saņem Freinda pilno adjuvantu (*FCA*).

1.5.1.3. Procedūra

1.5.1.3.1. Indukcija

0. diena – vielas ievadīšanas grupa

Pleca rajonā, kas ir atbrīvots no apmatojuma, intradermāli ievada trīs pārus 0,1 ml tilpuma injekciju tā, lai no katra pāra viena injekcija būtu savā viduslīnijas pusē.

1. injekcija: *FCA*/ūdens vai *FCA*/fizioloģiskā sāls šķīduma maisījums attiecībā 1:1 (tilp./tilp.).

2. injekcija: testa viela piemērotā nesējā izraudzītajā koncentrācijā.

3. injekcija: testa viela izraudzītajā koncentrācijā, kas sagatavota *FCA*/ūdens vai *FCA*/fizioloģiskā sāls šķīduma maisījumā attiecībā 1:1 (tilp./tilp.).

3. injekcijai ūdenī šķīstošās vielas pirms sajaukšanas ar *FCA* izšķīdina ūdens fāzē. Taukos šķīstošās vai nešķīstošās vielas pirms ūdens fāzes pievienošanas suspendē *FCA*. Testa vielas galīgā koncentrācija ir vienāda ar koncentrāciju, ko izmanto 2. injekcijā.

▼B

1. un 2. injekciju ievada tuvu vienu otrai un tuvāk galvai, bet 3. injekciju ievada testa laukuma kaudālajā daļā.

0. diena – kontroles grupa

Intradermāli ievada trīs pārus 0,1 ml tilpuma injekciju tajās pašās vietās kā vielas ievadīšanas grupas dzīvniekiem.

1. injekcija: *FCA*/ūdens vai *FCA*/fizioloģiskā sāls šķīduma maisījums attiecībā 1:1 (tilp./tilp.).

2. injekcija: neatšķaidīts nesējs.

3. injekcija: 50 % svars/tilp. attiecībā nesējs samaisīts ar *FCA*/ūdens vai *FCA*/fizioloģiskā sāls šķīduma 1:1 (tilp./tilp.) maisījumu.

5.–7. diena – vielas ievadīšanas un kontroles grupa

Aptuveni 24 stundas pirms vietējās indukcijas pielietošanas, ja viela nekairina ādu, testa laukumu pēc nocirpšanas tuvu ādai un/vai noskūšanas apstrādā ar 0,5 ml 10 % nātrija laurilsulfāta vazelīnā, lai radītu vietēju kairinājumu.

6.–8. diena – vielas ievadīšanas grupa

Testa laukumā vēlreiz notīra apmatojumu. Filtrpapīru (2 × 4 cm) pilnīgi piesātina ar testa vielu piemērotā nesējā, uzliek testa laukumam un tur saskarē ar ādu 48 stundas, izmantojot okluzīvu pārsēju. Nesēja izvēle ir jāpamato. Cietas vielas sasmalcina smalkā pulverī un iejauc piemērotā nesējā. Šķidrumus var attiecīgā gadījumā pielietot neatšķaidītus.

6.–8. diena – kontroles grupa

Testa laukumā vēlreiz notīra apmatojumu. Testa laukumā līdzīgi pielieto tikai nesēju un tur saskarē ar ādu 48 stundas, izmantojot okluzīvu pārsēju.

1.5.1.3.2. Provocēšana

20.–22. diena – vielas ievadīšanas un kontroles grupa

Vielas ievadīšanas un kontroles dzīvnieku sāniem notīra apmatojumu. Ar testa vielu piesātinātu kompresi vai pildītu iedobi pieliek vienam dzīvnieka sānam un attiecīgā gadījumā ar nesēju piesātinātu kompresi vai pildītu iedobi pieliek otram sānam. Kompreses tur saskarē ar ādu 24 stundas, izmantojot okluzīvu pārsēju.

1.5.1.3.3. Novērošana un izvērtēšana: vielas ievadīšanas un kontroles grupa

— Aptuveni 21 stundu pēc kompreses noņemšanas provocēto laukumu notīra un tuvu ādai nocērp un/vai noskuj un vajadzības gadījumā izdara depilāciju,

— aptuveni trīs stundas vēlāk (aptuveni 48 stundas pēc provocēšanas sākuma) izdara ādas reakcijas novērojumus un protokolē saskaņā ar pielikumuma papildinājumā parādītajām pakāpēm,

— aptuveni 24 stundas pēc šo novērojumu izdarīšanas izdara otru (72 stundu) novērojumu un vēlreiz protokolē.

Ir atbalstāmi aklie nolasījumi testa un kontroles dzīvniekiem.

Ja ir jāprecizē pirmajā provocēšanā iegūtie rezultāti, ir jāapsver otrā provocēšana (t. i., atkārtota provocēšana) vajadzības gadījumā ar jaunu kontroles grupu aptuveni nedēļu pēc pirmās provocēšanas. Atkārtoto provocēšanu var izdarīt arī ar sākotnējo kontroles grupu.

▼B

Visas ādas reakcijas un neparastas konstatācijas, iekļaujot organisma sistēmiskās reakcijas, ko izraisījušas indukcijas un provocēšanas procedūras, ir jānovēro un jāprotokolē saskaņā ar Magnusona/Kligmana novērtējuma skalu (skatīt pielikuma papildinājumu). Lai precizētu neskaidras reakcijas, var izdarīt citas procedūras, piemēram, histopatoloģiskus izmeklējumus, ādas krokas biezuma mērījumus.

1.5.2. *Bīlera tests*

1.5.2.1. Sagatavošanās

Veselas, jaunas, pieaugušas albīnas jūrascūciņas vismaz piecas dienas pirms testa aklimatizē laboratorijas apstākļos. Pirms testa dzīvniekus izvēlas pēc nejaušās izvēles principa un iedala vielas ievadīšanas grupās. Apmatojumu noņem, cērpot, skujot vai varbūt ar ķīmisko depilāciju atkarībā no izmantotās testa metodes. Jāpievērš uzmanība, lai nenobrāztu ādu. Dzīvniekus nosver pirms testa uzsākšanas un testa beigās.

1.5.2.2. Testa apstākļi

1.5.2.2.1. Testa dzīvnieki

Izmanto albīno jūrascūciņu parasti izmantojamās laboratorijas līnijas.

1.5.2.2.2. Skaits un dzimums

Var izmantot vīriešu un/vai sieviešu dzimuma dzīvniekus. Ja izmanto mātītes, tām jābūt nedzemdējušām un negrūsnām.

Vielas ievadīšanas grupā izmanto vismaz 20 dzīvniekus un kontroles grupā vismaz 10 dzīvniekus.

1.5.2.2.3. Devu līmeņi

Katrā inducējošā iedarbībā testa vielas koncentrācijai jābūt iespējami lielākajai, kas rada vieglu līdz vidēju ādas kairinājumu. Provokatīvajā mijiedarbības testā izmantotajai koncentrācijai jābūt lielākajai devai, kas kairinājumu nerada. Vajadzības gadījumā atbilstīgās koncentrācijas var noteikt ievadpētījumā, kurā izmanto divus vai trīs dzīvniekus.

Par ūdenī šķīstošu testa materiālu nesēju ir lietderīgi izmantot ūdeni vai atšķaidītu nekairinošu virsmaktīvas vielas šķīdumu. Citu testa materiālu indukcijā ir vēlams 80 % etanola/ūdens maisījums un provocēšanā acetons.

1.5.2.3. Procedūra

1.5.2.3.1. Indukcija

0. diena – vielas ievadīšanas grupa

Vienam sānam notīra apmatojumu (nocērp tuvu ādai). Testa kompreses sistēmai jābūt pilnīgi piesātinātai ar testa vielu piemērotā nesējā (nesēja izvēle ir jāpamato; šķidras testa vielas var attiecīgā gadījumā pielietot neatšķaidītas).

Testa kompreses sistēmu pielieto testa laukumam un tur saskarē ar ādu, izmantojot okluzīvu kompresi vai iedobi un piemērotu pārsēju sešas stundas.

▼B

Testa kompreses sistēmai jābūt okluzīvai. Kokvilnas spilventiņš ir piemērots un var būt apaļš vai četrstūrains, bet tam jābūt aptuveni 4–6 cm^2. Lai nodrošinātu oklūziju, vēlams izmantot fiksāciju ar piemērotu fiksatoru. Ja izmanto apsaitēšanu, var būt vajadzīgas papildu pakļaušanas iedarbībai.

0. diena – kontroles grupa

Vienam sānam notīra apmatojumu (nocērp tuvu ādai). Pielieto tikai nesēju līdzīgi kā vielas ievadīšanas grupai. Testa kompreses sistēmu tur saskarē ar ādu sešas stundas, izmantojot okluzīvu kompresi vai iedobi un piemērotu pārsēju. Ja var parādīt, ka tukšā mēģinājuma kontroles grupa nav vajadzīga, var izmantot kontroles grupu, kas neko nesaņem.

6.–8. un 13.–15. diena – vielas ievadīšanas grupa un kontroles grupa

Rīkojas tāpat kā 0. dienā ar tā paša sāna to pašu testa laukumu (vajadzības gadījumā notīrot apmatojumu) 6.–8. dienā un vēlreiz 13.–15. dienā.

1.5.2.3.2. Provocēšana

27.–29. diena – vielas ievadīšanas un kontroles grupa

Vielas ievadīšanas un kontroles grupas dzīvnieku neapstrādātajam sānam notīra apmatojumu (nocērp tuvu ādai). Okluzīvu kompresi vai iedobi, kas satur atbilstīgu testa vielas daudzumu maksimālā nekairinošā koncentrācijā pielieto uz vielas ievadīšanas un kontroles dzīvnieku neapstrādātā sāna aizmugures daļas.

Attiecīgā gadījumā okluzīvu kompresi vai iedobi, kas satur tikai nesēju, arī pielieto uz vielas ievadīšanas un kontroles dzīvnieku neapstrādātā sāna aizmugures daļas. Kompreses vai iedobes sešas stundas tur saskarē ar ādu, izmantojot piemērotu pārsēju.

1.5.2.3.3. Novērošana un izvērtēšana

— Aptuveni 21 stundu pēc kompreses noņemšanas provocētajā laukumā notīra apmatojumu,

— aptuveni trīs stundas vēlāk (aptuveni 30 stundas pēc provocēšanas kompreses pielietošanas) izdara ādas reakcijas novērojumus un protokolē saskaņā ar pielikuma papildinājumā parādītajām pakāpēm,

— aptuveni 24 stundas pēc 30 stundu novērojumiem (aptuveni 54 stundas pēc provocēšanas kompreses pielietošanas) vēlreiz izdara ādas reakcijas novērojumus un protokolē.

Ir atbalstāmi aklie nolasījumi testa un kontroles dzīvniekiem.

Ja ir jāprecizē pirmajā provocēšanā iegūtie rezultāti, ir jāapsver otrā provocēšana (t. i., atkārtota provocēšana) vajadzības gadījumā ar jaunu kontroles grupu aptuveni nedēļu pēc pirmās provocēšanas. Atkārtoto provocēšanu var izdarīt arī ar sākotnējo kontroles grupu.

▼B

Visas ādas reakcijas un neparastas konstatācijas, iekļaujot organisma sistēmiskās reakcijas, ko izraisījušas indukcijas un provocēšanas procedūras, ir jānovēro un jāprotokolē saskaņā ar Magnusona/Kligmana novērtējuma skalu (skatīt pielikuma papildinājumu). Lai precizētu neskaidras reakcijas, var izdarīt citas procedūras, piemēram, histopatoloģiskus izmeklējumus, ādas krokas biezuma mērījumus.

2. **DATI (GPMT un Bīlera tests)**

Dati ir jāapkopo tabulas veidā, parādot katra dzīvnieka ādas reakcijas katrā novērošanā.

3. **ZIŅOJUMA SASTĀDĪŠANA (GPMT un Bīlera tests)**

Ja skrīninga testu izdara pirms jūrascūciņu testa, tad testa apraksts vai norāde uz to (piemēram, vietējais limfmezglu tests (*LLNA*), peļu ausu pietūkuma tests (MEST)), iekļaujot sīkus datus par procedūru, ir jāsniedz kopā ar rezultātiem, kas iegūti ar testa vielām un standartvielām.

Testa ziņojums (GPMT un Bīlera tests)

Testa ziņojumā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā jūrascūciņu līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

Testa apstākļi:

— kompreses vietas sagatavošanas paņēmiens,

— sīkas ziņas par izmantotajiem kompreses materiāliem un kompreses uzlikšanas paņēmienu,

— ievadpētījuma rezultāti ar secinājumu par testā izmantojamām inducēšanas un provocēšanas koncentrācijām,

— sīkas ziņas par testa vielas sagatavošanu, pielietošanu un noņemšanu,

— nesēja izvēles pamatojums,

— inducēšanā un provocēšanā izmantotās nesēja un testa vielas koncentrācijas un inducēšanā un provocēšanā izmantotais kopējais vielas daudzums.

Rezultāti:

— pēdējās jutības un ticamības pārbaudes rezultātu kopsavilkums (skatīt 1.3.), iekļaujot informāciju par izmantoto vielu, koncentrāciju un nesēju,

▼B

— visi novērojumi par katru dzīvnieku, iekļaujot vērtējumu,

— sīki izstrādāts apraksts par novēroto ietekmju būtību un pakāpi,

— histopatoloģiskas konstatācijas.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Šī metode ir analoga ESAO TG 406.

▼B

Papildinājums

TABULA

Magnusona/Kligmana novērtējumu skala kompreses provocēšanas testa reakcijām

0 = nav redzamu izmaiņu

1 = atsevišķi vai plankumveida apsārtumi

2 = vidēji stipri un saplūduši apsārtumi

3 = intensīvs apsārtums un uztūkums

▼M4

B.7. **ATKĀRTOTAS DEVAS 28 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR GRAUZĒJIEM**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 407 (2008. gads). Sākotnējos Testēšanas norādījumus 407 pieņēma 1981. gadā. Savukārt 1995. gadā pieņēma pārskatītu versiju, lai no pētījumā izmantota dzīvnieka iegūtu papildu informāciju, it sevišķi par neirotoksicitāti un imūntoksicitāti.

2. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos testēšanas norādījumus un izstrādātu jaunus testēšanas norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu (8). Viens no minētās rīcības elementiem bija esošo ESAO norādījumu "Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem" (*TG 407*) atjaunināšana ar parametriem, kas būtu piemēroti, lai noteiktu testējamo ķīmisko vielu endokrīno aktivitāti. Šai procedūrai īstenoja plašu starptautisku programmu, lai pārbaudītu papildu parametru būtiskumu un praktisko piemērojamību, šo parametru lietderīgumu attiecībā uz ķīmiskām vielām ar (anti)estrogēnisku, (anti)androgēnisku un (anti)tireoidālu iedarbību, rezultātu atkārtojamību laboratorijā un starp laboratorijām un jauno parametru ietekmi uz parametriem, kuri bija noteikti iepriekšējos *TG 407*. Tādējādi iegūtie apjomīgie dati ir apkopoti un detalizēti novērtēti vispusīgā ESAO ziņojumā (9). Šī atjauninātā B.7. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga *TG 407*) ir starptautiskās testēšanas programmas pieredzes un rezultātu kopsavilkums. Šī testēšanas metode ļauj noteiktu endokrīni pastarpinātu iedarbību aplūkot citas toksikoloģiskas iedarbības kontekstā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Pārbaudot un izvērtējot ķīmiskas vielas toksiskās īpašības, orālo toksicitāti ar atkārtotām devām var noteikt pēc tam, kad akūtās toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Šīs testēšanas metodes mērķis ir izpētīt, kā tiek skarts organisms ļoti daudzveidīgos toksicitātes aspektos. Šī metode sagādā informāciju par iespējamiem veselības apdraudējumiem, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai relatīvi ierobežotā laikā, arī par ietekmi uz nervu sistēmu, imūnsistēmu un endokrīno sistēmu. Attiecībā uz šiem konkrētajiem beigupunktiem ar šo metodi ir jānosaka ķīmiskas vielas ar tādām neirotoksiskām īpašībām, kuru dēļ varētu būt nepieciešams padziļināti izpētīt šo aspektu, un ķīmiskas vielas, kas ietekmē vairogdziedzera fizioloģiju. Tāpat ar šo metodi var iegūt datus par ķīmiskām vielām, kas ietekmē jaunu pieaugušo dzīvnieku vīrišķos un/vai sievišķos reproduktīvos orgānus, kā arī norādes par imunoloģisku ietekmi.

4. Šīs B.7. testēšanas metodes rezultāti ir jāizmanto apdraudējuma noteikšanai un riska novērtēšanai. Rezultāti, par ko liecina ar endokrīno sistēmu saistīti parametri, ir jāaplūko ESAO *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* kontekstā (11). Metodē ietilpst atkārtotas devas toksicitātes pamatpētījums, ko var izmantot ķīmiskām vielām, kurām nav nepieciešams veikt 90 dienu pētījumu (piemēram, ja ražošanas apjoms nepārsniedz noteiktas robežas), vai par provizorisku testu ilgtermiņa pētījumam. Ekspozīcijas ilgumam jābūt 28 dienām.

▼M4

5. Starptautiskā programma, ko īstenoja, lai validētu parametrus, kuri būtu piemēroti testējamo ķīmisko vielu endokrīnās aktivitātes iespējamai noteikšanai, apliecināja, ka ar testēšanas metodi iegūto datu kvalitāte lielā mērā būs atkarīga no testēšanas laboratorijas pieredzes. Tas attiecas tieši uz ciklisko pārmaiņu histopatoloģisko noteikšanu mātīšu reproduktīvajos orgānos un uz tādu nelielu hormonatkarīgu orgānu svara noteikšanu, kuru secēšana ir apgrūtināta. Ir izstrādāti norādījumi par histopatoloģiju (19). Tie ir pieejami ESAO publiskajā testēšanas norādījumu vietnē. To mērķis ir atbalstīt patologus pārbaužu veikšanā un palīdzēt paaugstināt testa jutību. Tika konstatēti vairāki parametri, kas liecina par toksicitāti, kura saistīta ar endokrīno sistēmu, un šie parametri ir ietverti šajā testēšanas metodē. Parametrus, par kuriem pieejamie dati pietiekami nepierādīja to lietderību vai kuri validēšanas programmā sevišķi izteikti neliecināja par noderīgumu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanā, ir ierosināts izmantot par neobligātiem beigupunktiem (sk. 2. papildinājumu).

6. Pamatojoties uz validēšanas procesā iegūtajiem datiem, jāuzsver, ka šī testa jutība nav pietiekama, lai noteiktu visas vielas ar (anti)estrogēnisku un (anti)androgēnisku iedarbību (9). Testēšanas metodi neīsteno tādā mūža posmā, kad jutība pret endokrīnās sistēmas traucējumiem ir visaugstākā. Tomēr validēšanas procesa laikā ar šo testēšanas metodi konstatēja vielas, kas vāji vai stipri ietekmē vairogdziedzera darbību, kā arī stipri un mēreni endokrīni aktīvas vielas, kas iedarbojas ar estrogēnu vai androgēnu receptoru starpniecību, bet lielākajā daļā gadījumu nespēja konstatēt endokrīni aktīvas vielas, kas vāji ietekmē estrogēnu vai androgēnu receptorus. Tādēļ to nevar uzskatīt pat endokrīnās aktivitātes noteikšanas testu.

7. Tas, ka šādas iedarbības sekas neizpaužas, vēl neliecina, ka iedarbība uz endokrīno sistēmu nenotiek. Tāpēc attiecībā uz endokrīni pastarpinātu iedarbību vielas raksturošanu nedrīkst balstīt uz šīs testēšanas metodes rezultātiem vien, tie ir jāizmanto uz apliecinājumiem balstītā pieejā, iespējamas endokrīnas aktivitātes raksturošanai apkopojot visus esošos datus par konkrēto ķīmisko vielu. Iepriekš aprakstītā iemesla dēļ regulatīviem lēmumiem par endokrīno aktivitāti (vielas raksturošana) jābalstās uz plašu pieeju, nevis tikai šīs testēšanas metodes piemērošanas rezultātiem.

8. Ir atzīts, ka visām procedūrām, kurās izmanto dzīvniekus, ir jāatbilst vietējiem dzīvnieku labturības standartiem. Turpmāk ir izklāstīti labturības un testu obligātie standarti, kurus aizstāj vietējie noteikumi, ja tie ir stingrāki. Papildu norādījumus par humānu attieksmi pret dzīvniekiem ir sniegusi ESAO (14).

9. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

10. Testējamo ķīmisko vielu pakāpeniski pieaugošās devās katru dienu orāli ievada vairākām eksperimenta dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai 28 dienu periodā. Vielas ievadīšanas laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko eitanazē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus eitanazē, un arī tiem izdara autopsiju. 28 dienu pētījums sniedz

▼M4

informāciju par atkārtotas orālas ekspozīcijas iedarbību un var norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākus ilgtermiņa pētījumus. Tas var arī sniegt informāciju par koncentrāciju izvēli ilgāka termiņa pētījumiem. No šīs testēšanas metodes izmantošanas iegūtajiem datiem jānodrošina iespēja raksturot testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, norādīt devas un atbildes reakcijas sakarību un noteikt nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni (*NOAEL*).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

11. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas. Ja šajā B.7. testēšanas metodē noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Lai gan bioloģiski ir iespējams, ka citas sugas uz toksiskajām vielām reaģēs līdzīgi žurkām, mazāku sugu izmantošana var palielināt mainību, jo mazāku orgānu secēšana ir tehniski sarežģīta. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanai izmantoja tikai žurkas. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Devu došana jāsāk iespējami drīz pēc tam, kad dzīvniekus beigts zīdīt, un noteikti pirms tie sasnieguši deviņu nedēļu vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no katra dzimuma vidējā svara. Ja atkārtotas devas orālo pētījumu veic kā ilgāka termiņa pētījuma provizorisko testu, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

12. Visām procedūrām ir jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Temperatūrai telpās, kurās tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk par 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šādu metodi. Dzīvniekus vajadzētu turēt nelielās viendzimuma grupās. Ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Turot dzīvniekus grupās, skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5.

13. Barība ir regulāri jāanalizē, lai noteiktu piesārņotāju klātbūtni. Barības paraugs ir jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

14. Veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti sadala kontroles un testa grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Dzīvniekiem piešķir unikālu identifikāciju un līdz testa sākumam tos vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

15. Testējamo ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu vai ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Orālās ievadīšanas metode ir atkarīga no pētījuma mērķa un no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām/ķīmiskajām/toksiskajām un kinētiskajām īpašībām.

▼M4

16. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/suspensiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte nesējvielā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

17. Katram devas līmenim jāizmanto vismaz 10 dzīvnieki (piecas mātītes un pieci tēviņi). Ja dzīvnieku eitanāzija paredzēta arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus paredzēts eitanazēt pirms pētījuma pabeigšanas. Jāapsver iespēja izmantot papildu 10 dzīvnieku satelītgrupas (pieci no katra dzimuma) iekļaušanu kontrolgrupā un lielākās devas grupā, lai vismaz 14 dienas pēc vielas ievadīšanas novērotu toksiskās iedarbības atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos.

Dozējums

18. Parasti ir jāizmanto vismaz trīs testa grupas un viena kontrolgrupa, bet, ja no pieejamajiem datiem izriet, ka 1 000 mg/kg bw/d deva nekādu iedarbību neradīs, var veikt pieļaujamā daudzuma testu. Ja piemēroti dati nav pieejami, var izdarīt diapazona noteikšanas pētījumu (ar vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem), kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada kopā ar nesējvielu, kontrolgrupa saņem maksimālo izmantoto nesējvielas daudzumu.

19. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā esošos toksicitātes un toksikokinētiskos vai kinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgajām ķīmiskajām vielām. Augstākais devas līmenis ir jāizvēlas ar mērķi izraisīt toksisku iedarbību, bet ne nobeigšanos vai smagas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas devu līmeņi tādā lejupejošā secībā, lai pierādītu jebkādas ar devām saistītas atbildes reakcijas un zemāko devas līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (*NOAEL*). Lejupejošo devu līmeņu noteikšanai bieži optimāli ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un nereti ir ieteicamāks pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus (piemēram, pārsniedzot koeficientu 10) starp devu došanu.

20. Ja ir novērota vispārīga toksiska reakcija (piemēram, samazināts ķermeņa svars, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildes reakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz imunoloģiskajiem, neiroloģiskajiem vai endokrīnajiem beigupunktiem.

Pieļaujamā daudzuma tests

21. Ja, izdarot testu vienā devas līmenī, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā vai – attiecībā uz vielu, kas ievadīta ar uzturu vai dzeramo ūdeni, – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzeramajā ūdenī (aprēķināts pēc noteiktajiem ķermeņa svariem) un izmantojot šim pētījumam paredzētās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar trīs devu līmeņiem nav vajadzīgs. Izņemot gadījumu, kur iedarbība uz cilvēku norāda, ka jāizmanto augstāks devas līmenis, piemēro pieļaujamā daudzuma testu.

▼M4

Devu ievadīšana

22. Testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem dod ik dienu septiņas dienas nedēļā 28 dienu ilgā laikā. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu, viela ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli dzīvniekiem jāievada vienreizējā devā. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumus, kad var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Izņemot kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir iespējami jāsamazina testā lietotā tilpuma mainība, koriģējot koncentrāciju tā, lai ar visiem devu līmeņiem tilpums būtu vienāds.

23. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ir jānorāda izmantotā alternatīva. Ja ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu, deva katru dienu jāievada līdzīgā laikā un pēc vajadzības jākoriģē, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja atkārtotas devas pētījumu izmanto par ilgtermiņa pētījuma provizorisko testu, abos pētījumos jāizmanto tāds pats uzturs.

Novērojumi

24. Novērošanas periodam jābūt 28 dienām. Satelītgrupas dzīvnieki, kam paredzēti papildu novērojumi, ir jātur vismaz 14 dienas bez vielas saņemšanas, lai noteiktu toksiskas ietekmes aizkavētu parādīšanos, noturību vai izveseļošanos no tās.

25. Vismaz reizi dienā ir jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi, vēlams, vienādos laikos katru dienu, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc vielas došanas. Dzīvnieku veselības stāvoklis ir jāreģistrē. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz saslimstību un mirstību.

26. Vienu reizi pirms pirmās ekspozīcijas (lai varētu izdarīt salīdzināšanu vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vismaz reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojumi visiem dzīvniekiem. Šie novērojumi jāizdara ārpus dzīvnieka turēšanas būra standartnožogojumā, ieteicams, katru reizi vienā un tajā pašā dienas laikā. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai testēšanas apstākļu mainība būtu minimāla un lai novērošanu izdarītu novērotāji, kas nav informēti par vielas ievadīšanu. Protokolējamās pazīmēs jāiekļauj (bet ne tikai) pārmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādā, sekrēcija un izdalījumi, kā arī veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametrs un neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī klonisko un tonisko kustību klātesamība, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, sakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (2).

27. Ceturtajā ekspozīcijas nedēļā ir jānovērtē sensoriskās reakcijas uz dažāda veida (2) kairinājumiem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinātājiem) (3) (4) (5), kā arī jānovērtē satveršanas stiprums (6) un motoriskā aktivitāte (7). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.

▼M4

28. Funkcionālos novērojumus, kurus veic 4. ekspozīcijas nedēļā, var neveikt, ja pētījumu veic kā turpmāka subhroniskās toksicitātes (90 dienu) pētījuma provizorisko pētījumu. Tādā gadījumā funkcionālie novērojumi ir jāiekļauj šajā turpmākajā pētījumā. Tomēr atkārtotas devas pētījumā iegūtie funkcionālo novērojumu dati var atvieglot devu līmeņu izvēli turpmākajam subhroniskās toksicitātes pētījumam.

29. Izņēmuma gadījumos funkcionālos novērojumus var arī neveikt tām dzīvnieku grupām, kurām arī bez šādiem novērojumiem izpaužas tādas toksicitātes pazīmes, kas ievērojami traucētu funkcionālā testa norisi.

30. Veicot autopsiju, visām mātītēm pēc vaginālajām uztriepēm var noteikt (pēc izvēles) estrālo ciklu. Šie novērojumi nodrošinās informāciju par estrālā cikla posmu nonāvēšanas laikā un palīdzēs histoloģiski izvērtēt pret estrogēniem jutīgus audus (sk. norādījumus par histopatoloģiju (19)).

Ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš

31. Visi dzīvnieki jānosver vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni, arī ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā.

Hematoloģija

32. Testa laika beigās ir jāizdara šādi hematoloģiskie izmeklējumi: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaits, retikulocīti, leikocītu kopējais un diferenciālais skaits, trombocītu skaits un asins recēšanas laiks/spēja. Ja testējamajai ķīmiskajai vielai vai tās vispārpieņemtiem metabolītiem ir vai varētu būt oksidējošas īpašības, jānosaka arī methemoglobīna koncentrācija un Heinca ķermenīši.

33. Asins paraugi jāņem no precīzi norādītas vietas tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās laikā un jāglabā piemērotos apstākļos. Pirms eitanāzijas dzīvniekus iepriekšējā naktī nebaro ([1]).

Klīniskā bioķīmija

34. Klīniski bioķīmiskā noteikšana, kurā pēta būtisku toksisko ietekmi uz audiem un, konkrētāk, ietekmi uz nierēm un aknām, jāveic ar tiem asins paraugiem, kuri paņemti no katra dzīvnieka tieši pirms dzīvnieka eitanāzijas vai tās laikā (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kuri atrasti mirstoši un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām). Plazmā vai serumā nosaka nātriju, kāliju, glikozi, kopējo holesterīnu, urīnvielu, kreatinīnu, kopējo olbaltumu un albumīnu un vismaz divus fermentus, kas norāda uz hepatocelulāro ietekmi (piemēram, alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, alkalīnfosfatāze, γ-glutamiltranspeptidāze un glutamīna dehidrogenāze), kā arī žultsskābes. Noteiktos apstākļos noderīgu informāciju var sniegt papildu fermentu (aknu fermentu vai citu fermentu) un bilirubīna noteikšana.

35. Pēdējā pētījuma nedēļā pēc izvēles var izdarīt šādas urīnanalīzes, izmantojot urīna savākšanu iepriekš noteiktā laika periodā: izskats, tilpums, osmolalitāte vai īpatnējais svars, pH, olbaltumvielas, glikoze un asinis/asins šūnas.

([1]) Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekiem pirms asins ņemšanas uz nakti nedot barību. Tas ieteicams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami paaugstinātu mainību, tādējādi drīzāk maskējot vāji izteiktu iedarbību un apgrūtinot interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var traucēt dzīvnieku vispārējo vielmaiņu un – jo īpaši barošanas pētījumos – var izjaukt testējamās ķīmiskās vielas parasto iedarbību. Ja tiek izlemts dzīvniekus uz nakti atstāt bez barības, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas ceturtajā nedēļā.

▼M4

36. Turklāt jāapsver, vai neveikt pētījumus par audu vispārīgu bojājumu marķieriem plazmā vai serumā. Ja testējamās ķīmiskās vielas zināmās īpašības ietekmē vai varētu ietekmēt attiecīgos metaboliskos profilus, jānoteic kalcijs, fosfāti, triglicerīdi, atsevišķi hormoni un holīnesterāze. Šie faktori ir jānosaka konkrētu klašu ķīmiskajām vielām vai katrā gadījumā atsevišķi.

37. Lai gan starptautiskā izvērtēšanā par beigupunktiem, kas saistīti ar endokrīno sistēmu, nevarēja pierādīt, ka tos būtu izdevīgi izmantot vairogdziedzera hormonu (T3, T4) un *TSH* noteikšanā, ja ir liecības par ietekmi uz hipofīzes un vairogdziedzera asi, varētu būt lietderīgi saglabāt plazmas vai seruma paraugus, lai varētu izmērīt T3, T4 un *TSH* (nav obligāti). Šos paraugus uzglabāšanas nolūkos var sasaldēt – 20 °C. Turpmāk norādītie faktori var ietekmēt noteikto hormonu mainību un absolūtās koncentrācijas:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

— nonāvēšanas metode – dzīvniekiem nav jārada nevajadzīgs stress, kurš varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas komplekti, kas var atšķirties pēc standarta līknēm.

Vairogdziedzera aktīvo ķīmisko vielu galīgā noteikšana ir ticamāka ar histopatoloģisko analīzi, nevis pēc hormonu līmeņiem.

38. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Ieteicams apsvērt iespēju noteikt T3, T4 un *TSH*, pamatojoties uz histopatoloģiski konstatētām vairogdziedzera pārmaiņām. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem. Tādējādi var nebūt iespējams nodrošināt tādus snieguma kritērijus, kuru pamatā ir vienoti vēsturiski dati. Tā vietā laboratorijām jācenšas nodrošināt, ka T3 un T4 mainības kontroles koeficienti nepārsniedz 25, savukārt *TSH* – 35. Visas koncentrācijas ir jāreģistrē, izsakot tās ng/ml.

39. Ja vēsturiskie izejdati ir nepietiekami, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniski bioķīmiskos mainīgos lielumus pirms devu došanas sākšanas vai, ieteicams, dzīvniekiem, kas nav ietverti eksperimentālajās grupās.

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

40. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Visu dzīvnieku (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kas atrasti mirstoši un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām) aknas, nieres, virsnieru dziedzeri, sēklinieki, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar koagulācijas dziedzeri, tīms, liesa, smadzenes un sirds ir jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem, un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic to natīvais svars. Atbrīvojot no audiem prostatu, ir jāuzmanās, lai nepārspiestu ar šķidrumu pildītos sēklas pūslīšus. Sēklas pūslīšus un prostatu var arī atbrīvot no audiem un nosvērt pēc fiksācijas.

▼M4

41. Vēl divus cita veida audus var pēc izvēles nosvērt iespējami drīz pēc secēšanas, lai izvairītos no izžūšanas: abas olnīcas (natīvais svars) un dzemdi, arī dzemdes kaklu (norādījumi par dzemdes audu izņemšanu un sagatavošanu nosvēršanai ir sniegti ESAO *TG 440* (18)).

42. Vairogdziedzera svaru (pēc izvēles) var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai audus nesabojātu. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi.

43. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audiem, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (sk. 47. punktu), ir jāsaglabā turpmāk minētie audi: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvi apgabali, tostarp lielās smadzenes, smadzenītes un iegarenās smadzenes / smadzeņu tilts), muguras smadzenes, acis, kuņģis, tievās un resnās zarnas (arī kopu limfātiskie jeb Peijera mezgliņi), aknas, nieres, virsnieru dziedzeri, liesa, sirds, tīms, vairogdziedzeris, traheja un plaušas (konservētas, piepūšot ar fiksācijas šķīdumu un pēc tam iegremdējot), gonādas (sēklinieki un olnīcas), papildu dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar koagulācijas dziedzeri), maksts, urīnpūslis, limfmezgli (saskaņā ar laboratorijas pieredzi papildus proksimālam drenējošam limfmezglam ir jāņem vēl viens limfmezgls (15)), perifērais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs), vēlams, tiešā muskuļa tuvumā, skeleta muskulis un kauls ar kaula smadzenēm (izgriezums vai, alternatīvi, svaigs kaula smadzeņu aspirāts). Ieteicama sēklinieku fiksācija, tos iegremdējot Buina fiksācijas šķīdumā vai Davidsona modificētā fiksācijas šķīdumā (16) (17). Bālganais apvalks ir uzmanīgi un sekli jāpārdur ar adatu abos orgāna galos, lai fiksācijas šķīdums varētu tajā ātri iekļūt. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem.

44. Vērtīgas norādes par endokrīnu iedarbību var gūt no šādiem audiem: gonādas (olnīcas un sēklinieki), papildu dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri, muguras un vēdera prostata), maksts, hipofīze, tēviņu krūts dziedzeris, vairogdziedzeris un virsnieru dziedzeris. Tēviņu krūts dziedzeru pārmaiņas nav pietiekami dokumentētas, taču šis parametrs var būt ļoti jutīgs pret vielām ar estrogēnisku iedarbību. To orgānu/audu novērojumi, kas nav uzskaitīti 43. punktā, nav obligāti (sk. 2. papildinājumu).

45. Norādījumos par histopatoloģiju (19) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu secēšanu, fiksāciju un histopatoloģiju.

46. Starptautiskajā testēšanas programmā tika iegūts apliecinājums tam, ka neizteiktu endokrīno ietekmi, ko rada ķīmiskās vielas ar zemu spēju ietekmēt dzimumhormonu homeostāzi, var labāk noteikt pēc estrālā cikla sinhronizācijas traucējumiem dažādos audos, nevis histopatoloģiski konstatētām mātīšu dzimumorgānu pārmaiņām. Lai gan galīgi pierādījumi par šādu iedarbību netika iegūti, interpretējot olnīcu (folikulārās šūnas, teka šūnas un granulozās šūnas), dzemdes, dzemdes kakla un maksts histopatoloģiju, ir ieteicams ņemt vērā liecības par estrālā cikla iespējamu asinhroniju. Ja tās tiek novērtētas, šajā salīdzinājumā varētu aplūkot arī cikla posmus, kas noteikti ar vaginālajām uztriepēm.

▼M4

Histopatoloģija

47. Visu kontrolgrupas un lielāko devu grupu dzīvnieku saglabātajiem orgāniem un audiem ir jāizdara pilna histopatoloģiskā izmeklēšana. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas, minētā izmeklēšana jāveic visu citu devu grupu dzīvniekiem.

48. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi.

49. Ja izmanto satelītgrupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

50. Jānorāda dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, attiecībā uz katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kas testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ eitanazēti, un katras nobeigšanās vai eitanāzijas laiku, to dzīvnieku skaitu, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus, to smagumu un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi.

51. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Dažādu diapazona devu ietekmes salīdzināšanā jāizvairās no vairāku ilgumu testiem. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.

52. Lai kontrolētu kvalitāti, ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

53. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums, ja nesējviela nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā,

— sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas apstākļi:

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu, sasniegto koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

▼**M4**

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa svara dienā),

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Izmeklētie neobligātie beigupunkti:

— izmeklēto neobligāto beigupunktu saraksts.

Rezultāti:

— ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,

— attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,

— dati par toksisko atbildes reakciju pēc dzimuma un devu līmeņa, ieskaitot toksicitātes pazīmes,

— klīniski novērotās ietekmes veids, smagums un ilgums (vai nu atgriezeniska, vai neatgriezeniska ietekme),

— sensoriskās aktivitātes, satveršanas stipruma un motoriskās aktivitātes novērtējums,

— hematoloģiskie testi ar attiecīgajām izejvērtībām,

— klīniski bioķīmiskie testi ar attiecīgajām izejvērtībām,

— ķermeņa svars eitanāzijas laikā un orgānu svars,

— autopsijas atrade,

— visu histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts,

— dati par absorbciju, ja pieejami,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams.

Komentāri par rezultātiem

Secinājumi

▼M4

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Androgenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17ß) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska vairogdziedzera hormona (piemēram, T_3) darbību.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās došanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķīmiskās vielas svaru uz testa dzīvnieka ķermeņa svara vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa svara dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Acīmredzama toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt risku, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksiskās iedarbības pazīmes un, iespējams, mirstību.

NOAEL ir akronīms, kas apzīmē līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17ß).

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Tireoidāla iedarbība ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam vairogdziedzera hormonam (piemēram, T_3).

Validēšana ir zinātnisks process, kas paredzēts, lai noskaidrotu prasības un ierobežojumus testēšanas metodes izmantošanā un pierādītu metodes uzticamību un noderību konkrētam nolūkam.

▼M4

2. papildinājums

Ieteicamie beigupunkti, pēc kuriem B.7. testēšanas metodes ietvaros noteic endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītājus

Obligātie beigupunkti	Neobligātie beigupunkti
Svars	
— Sēklinieki	— Olnīcas
— Sēklinieku piedēkļi	— Dzemde un dzemdes kakls
— Virsnieru dziedzeri	— Vairogdziedzeris
— Prostata un sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri	
Histopatoloģija	
— Gonādas:	— Vaginālās uztriepes
— sēklinieki	— Tēviņu krūts dziedzeri
— olnīcas	— Hipofīze
— Dzimumorgānu sistēmas palīgorgāni:	
— sēklinieku piedēkļi	
— prostata un sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri	
— dzemde un dzemdes kakls	
— Virsnieru dziedzeris	
— Vairogdziedzeris	
— Maksts	
Hormonu mērījumi	
	— T3, T4 aprites līmeņi
	— *TSH* aprites līmeņi

LITERATŪRA

(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-11th 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. **SUBAKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 28 DIENU PĒTĪJUMS**

KOPSAVILKUMS

Šī pārskatītā B.8. testēšanas metode ir izstrādāta, lai pilnībā raksturotu testējamās ķīmiskās vielas inhalācijas toksicitāti pēc atkārtotas ekspozīcijas uz ierobežotu laiku (28 dienas) un lai nodrošinātu datus kvantitatīviem inhalācijas riska novērtējumiem. Vismaz piecu tēviņu un piecu mātīšu grauzēju grupas sešas stundas dienā 28 dienas tiek pakļautas a) testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai trīs vai vairākos koncentrācijas līmeņos; b) filtrēta gaisa (negatīva kontrole) iedarbībai; un/vai c) nesējvielas iedarbībai (nesējvielas kontrole). Dzīvniekus parasti iedarbībai pakļauj piecas dienas nedēļā, bet ir atļauta arī ekspozīcija septiņas dienas nedēļā. Testā vienmēr ietver gan tēviņus, gan mātītes, bet tos var pakļaut dažādiem koncentrācijas līmeņiem, ja ir zināms, ka viens dzimums pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks. Šī metode pētījuma vadītājam nodrošina iespēju, lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, paredzēt satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas), bronhoalveolāro lavāžu (*BAL*), neiroloģiskos testus un papildu klīniski patoloģiskos un histopatoloģiskos izvērtējumus.

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 412 (2009. gads). Subakūtajai inhalācijas toksicitātei veltīto Testēšanas norādījumu 412 (*TG 412*) sākotnējā versija tika pieņemta 1981. gadā (1). Šī B.8. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga pārskatītajiem *TG 412*) ir atjaunināta, lai atspoguļotu zinātniskos atklājumus un lai nodrošinātu atbilstību pašreizējām un turpmākajām regulatīvajām vajadzībām.

2. Šī metode ļauj raksturot nelabvēlīgo ietekmi pēc katru dienu atkārtotas inhalatīvās ekspozīcijas testējamajai ķīmiskajai vielai 28 dienu laikā. Datus, ko iegūst 28 dienu subakūtās inhalācijas toksicitātes pētījumos, var izmantot kvantitatīviem riska novērtējumiem (ja tiem neseko 90 dienu subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījums (šā pielikuma B.29. nodaļa)). Dati var arī sniegt informāciju par koncentrāciju izvēli ilgāka termiņa pētījumiem, piemēram, 90 dienu subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumam. Šī testēšanas metode nav īpaši paredzēta nanomateriālu testēšanai. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 39 (2).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, testēšanas laboratorijai ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs izvēlēties attiecīgas testa koncentrācijas, var ietvert testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; kā arī datus, kas iegūti no akūtās inhalācijas toksicitātes testiem. Ja tiek paredzēta vai pētījuma gaitā novērota neirotoksicitāte, pētījuma vadītājs var izmantot attiecīgus izvērtējumus, piemēram, funkcionālo novērojumu sēriju (*FOB*) un motoriskās aktivitātes mērījumus. Lai gan ekspozīciju laika pieskaņošanai konkrētiem izmeklējumiem var būt izšķiroša nozīme, šo papilddarbību īstenošana nedrīkst traucēt pamatpētījuma plānam.

▼M4

4. Kairinošu vai kodīgu testējamo ķīmisko vielu atšķaidījumus var testēt koncentrācijās, kas nodrošinās vajadzīgo toksicitātes pakāpi (sk. *GD 39* (2)). Pakļaujot dzīvniekus šo materiālu iedarbībai, mērķkoncentrācijām jābūt pietiekami zemām, lai neradītu izteiktas sāpes un ciešanas, tomēr tām jābūt pietiekamām, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līknes pagarinātu līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, vēlams, pamatojoties uz attiecīgi izplānotu diapazona noteikšanas pētījumu, kas sniedz informāciju par kritisko beigupunktu, kairinājuma slieksni un ietekmes sākumu (sk. 11.–13. punktu). Izraudzītās koncentrācijas jāpamato.

5. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē. Mirstošos dzīvniekus ņem vērā tāpat kā testa laikā mirušos dzīvniekus. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

6. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši grauzēji, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Dienā, kad veic nejaušinātu izvēli, dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem dzīvniekiem 7–9 nedēļu vecumā. Ķermeņa svaram jābūt ± 20 % no katra dzimuma vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas nejaušināti, marķē individuālai identificēšanai un līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Dzīvnieku turēšana

8. Lai atvieglotu novērojumu veikšanu un izvairītos no pārpratumiem, dzīvnieki ir individuāli jāidentificē, ja iespējams, ar zemādas retranslatoriem. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam ir jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

▼M4

Inhalācijas kameras

9. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas veids un testa priekšmets. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmienu principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti *GD 39* (2).

TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI

Robežkoncentrācijas

10. Pretēji akūtās toksicitātes pētījumiem 28 dienu subakūtās inhalācijas toksicitātes pētījumiem nav noteiktu robežkoncentrāciju. Nosakot maksimālās testa koncentrācijas, jāņem vērā: 1) maksimālā sasniedzamā koncentrācija; 2) cilvēka ekspozīcijas līmeņa "sliktākais scenārijs"; 3) nepieciešamība saglabāt pietiekamu skābekļa padevi; un/vai 4) dzīvnieku labturības apsvērumi. Ja nav pieejami ar datiem pamatoti ierobežojumi, var izmantot Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (13) noteiktās akūtās toksicitātes robežkoncentrācijas (t. i., līdz maksimālajai koncentrācijai 5 mg/l aerosoliem, 20 mg/l tvaikiem un 20 000 ppm gāzēm) (sk. *GD 39* (2)). Ja, testējot gāzes vai ļoti gaistošas testējamās ķīmiskās vielas (piemēram, aukstumaģentus), ir nepieciešams pārsniegt šīs robežvērtības, tas jāpamato. Robežkoncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).

Diapazona noteikšanas pētījums

11. Pirms galvenā pētījuma sākšanas var būt nepieciešams veikt diapazona noteikšanas pētījumu. Diapazona noteikšanas pētījums ir vispusīgāks par devu diapazona pētījumu, jo tas neattiecas tikai uz koncentrāciju izvēli. Diapazona noteikšanas pētījumā iegūtās zināšanas var palīdzēt sekmīgi īstenot galveno pētījumu. Piemēram, diapazona noteikšanas pētījuma rezultātā var iegūt tehnisku informāciju par analītiskajām metodēm, daļiņu lieluma noteikšanu un toksisku mehānismu atklāšanu, klīniskās patoloģijas un histopatoloģijas datus, kā arī aplēses par to, kādas varētu būt galvenā pētījuma *NOAEL* un *MTC* koncentrācijas. Pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot diapazona noteikšanas pētījumu, lai noteiktu elpošanas sistēmas kairinājuma slieksni (piemēram, ar elpošanas sistēmas histopatoloģiju, plaušu funkcijas testēšanu vai bronhoalveolāru lavāžu), augstāko koncentrāciju, kas ir panesama, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu, un parametrus, kuri vislabāk raksturos testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu.

12. Diapazona noteikšanas pētījumā var aplūkot vienu vai vairākus koncentrācijas līmeņus. Katra koncentrācijas līmeņa iedarbībai nevajadzētu pakļaut vairāk kā trīs tēviņus un trīs mātītes. Diapazona noteikšanas pētījumam jāilgst vismaz piecas dienas un parasti ne vairāk kā 14 dienas. Pētījuma ziņojumā tas jāpamato galvenā pētījuma koncentrāciju izvēlei. Galvenā pētījuma mērķis ir parādīt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, pamatojoties uz prognozēto jutīgāko beigupunktu. Par zemāko koncentrāciju ieteicams izvēlēties koncentrāciju, ar kuru nav novērojama nelabvēlīga ietekme, savukārt augstākajai koncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu un neietekmējot to mūža ilgumu (3).

▼M4

13. Izvēloties koncentrācijas līmeņus diapazona noteikšanas pētījumam, jāņem vērā visa pieejamā informācija, tostarp struktūras un aktivitātes sakarības un dati par līdzīgām ķīmiskajām vielām (sk. 3. punktu). Diapazona noteikšanas pētījumā var verificēt/atspēkot viedokļus par jutīgākajiem mehāniskajiem beigupunktiem, tādiem kā holīnesterāzes inhibēšana ar organofosfātiem, methemoglobīna veidošanās ar eritrocītiem toksiskiem preparātiem, vairogdziedzerim toksisku vielu ietekme uz vairogdziedzera hormoniem (T_3, T_4), bronhoalveolārā lavāžā konstatētas olbaltumvielas, *LDH* vai neitrofīli attiecībā uz inertām mazšķīstošām daļiņām vai plaušas kairinošiem aerosoliem.

Galvenais pētījums

14. Subakūtās toksicitātes galvenais pētījums parasti aptver trīs koncentrācijas līmeņus, kā arī pēc vajadzības līdztekus veiktu negatīvu (gaisa) un/vai nesējvielas kontroli (sk. 17. punktu). Izvēloties attiecīgus ekspozīcijas līmeņus, ir jāizmanto visi pieejamie dati, tostarp sistēmiskās toksicitātes pētījumu, metabolisma un kinētikas rezultāti (īpaši jācenšas izvairīties no augstiem koncentrācijas līmeņiem, kas piesātina kinētiskos procesus). Katrā testa grupā ir vismaz 10 grauzēji (pieci tēviņi un piecas mātītes), ko pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai sešas stundas dienā piecas dienas nedēļā četras nedēļas pēc kārtas (kopējais pētījuma ilgums ir 28 dienas). Dzīvniekus var iedarbībai pakļaut arī septiņas dienas nedēļā (piemēram, testējot ieelpojamus farmaceitiskos preparātus). Ja ir zināms, ka kāds no dzimumiem pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks, dzimumus var pakļaut dažādu koncentrācijas līmeņu iedarbībai, lai optimizētu koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, kā aprakstīts 15. punktā. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja ekspozīcijas ilgums dienā ir mazāks par sešām stundām vai ja ir jāveic liela ilguma (piemēram, 22 stundas dienā) visa ķermeņa ekspozīcijas pētījums, tas jāpamato (sk. *GD 39* (2)). Ekspozīcijas laikā dzīvniekus nevajadzētu barot, ja vien ekspozīcija neilgst vairāk par sešām stundām. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.

15. Ar izraudzītajām mērķkoncentrācijām ir jānoskaidro mērķorgāns(-i) un jāparāda skaidra koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarība:

— augstākajam koncentrācijas līmenim ir jāizraisa toksiska ietekme, bet tas nedrīkst radīt ilgstošas pazīmes vai mirstību, kuras dēļ nebūtu iespējama lietderīga izvērtēšana,

— vidējiem koncentrācijas līmeņiem ir jābūt pakāpeniskiem, lai starp zemākās un augstākās koncentrācijas iedarbību būtu novērojama pakāpeniska toksiska ietekme,

— zemākajā koncentrācijas līmenī toksicitātei ir jāizpaužas maz vai vispār nav jāizpaužas.

Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījums

16. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījumu var izmantot, lai novērotu toksicitātes atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos attiecīgā laikā (bet ne mazāk kā 14 dienas) pēc vielas ievadīšanas. Satelītgrupās (atgriezeniskuma grupās) ir pieci tēviņi un piecas mātītes, ko eksponē vienlaikus ar galvenā pētījuma eksperimentālajiem dzīvniekiem. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) ir jāpakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai augstākajā koncentrācijas līmenī, kā arī pēc vajadzības līdztekus jāizmanto gaisa un/vai nesējvielas kontrolgrupas (sk. 17. punktu).

▼M4

Kontroldzīvnieki

17. Ar līdztekus veiktajā negatīvajā (gaisa) kontrolē izmantotajiem dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem, izņemot to, ka tos pakļauj filtrēta gaisa, nevis testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Ja testa atmosfēras ģenerēšanai izmanto ūdeni vai citu vielu, pētījumā negatīvas (gaisa) kontroles grupas vietā ir jāizmanto nesējvielas kontroles grupa. Kad vien iespējams, par nesējvielu ir jāizmanto ūdens. Ja par nesējvielu izmanto ūdeni, kontroldzīvniekus pakļauj tāda gaisa iedarbībai, kura relatīvais mitrums atbilst ekspozīcijas gaisa mitrumam. Piemērota nesējviela jāizvēlas, balstoties uz pienācīgi veiktu priekšizpēti vai vēsturiskiem datiem. Ja nesējvielas toksiskums nav droši zināms, pētījuma vadītājs dažkārt izmanto gan negatīvas (gaisa) kontroles grupu, gan nesējvielas kontroles grupu, bet tas nekādā ziņā nav ieteicams. Ja vēsturiskie dati norāda, ka nesējviela nav toksiska, negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav nepieciešama un ir jāizmanto vienīgi nesējvielas kontroles grupa. Ja kādā nesējvielā iestrādātās testējamās ķīmiskās vielas priekšizpētē toksicitāti neatklāj, secina, ka šī nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska, un kontrolgrupai jāizmanto tieši šī nesējviela.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

18. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamas ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas. Lai samazinātu daļiņu lielumu, to materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem. Papildu norādījumi ir sniegti *GD 39* (2).

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

19. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (*MMAD*) diapazonā no 1 līdz 3 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (4). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas un šķiedrmateriāli šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

20. Testu ar testējamo ķīmisko vielu ir vēlams veikt bez nesējvielas. Ja ir nepieciešams izmantot nesējvielu, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu, priekšroka dodama ūdenim. Ja testējamo ķīmisko vielu izšķīdina nesējvielā, ir jāpierāda tās stabilitāte.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS

Gaisa plūsma caur kameru

21. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur ekspozīcijas kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai laiciskās stabilitātes) reāllaika monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos inhalācijas parametrus. Ja koncentrācija tiek uzraudzīta reāllaikā, gaisa plūsmu mērījumu biežumu var samazināt

▼M4

līdz vienam mērījumam katrā ekspozīcijas dienā. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana. Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šim standartam, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra. Ja pirmās dienas mērījumi parāda, ka šo gāzu līmeņi ir atbilstīgi, turpmāki mērījumi nav vajadzīgi.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

22. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā katras ekspozīcijas laikā, ja iespējams, ir nepārtraukti jāmonitorē un reizi stundā jāreģistrē relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

23. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko dala ar inhalācijas kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

24. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteikta dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka visas fāzes tika ievāktas ar izraudzīto metodi.

25. Ja iespējams, visa pētījuma laikā jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)

▼M4

26. Ekspozīcijas atmosfēra ir jāuztur iespējami nemainīga. Lai pierādītu ekspozīcijas apstākļu stabilitāti, var izmantot reāllaika monitoringa ierīci, piemēram, aerosolu fotometru aerosoliem vai kopējo ogļūdeņražu analizatoru tvaikiem. Katrā ekspozīcijas dienā katram ekspozīcijas līmenim faktiskā koncentrācija kamerā ir jāmēra vismaz tris reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, var pietikt ar vienu paraugu vienas ekspozīcijas laikā. Vēlams šo paraugu ievākt visu ekspozīcijas laiku. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem un ± 20 % šķidriem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst laikam, kurā tiek ģenerēta testējamā ķīmiskā viela. Tajā ieskaita laiku, kas vajadzīgs, lai kamerā sasniegtu līdzsvara stāvokli (t_{95}) un koncentrācijas samazināšanos. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti *GD 39* (2).

27. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi. Tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai indikatorvielai (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama *GD 39* (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

28. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz reizi nedēļā katram koncentrācijas līmenim, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju (APS). Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā.

29. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsitējs/gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. *GD 39* (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā visu testēto koncentrāciju gadījumā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecinošu datu ieguvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot pētījumu.

30. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību.

NOVĒROJUMI

31. Dzīvnieki ir klīniski jānovēro pirms un pēc ekspozīcijas perioda, kā arī tā laikā. Atkarībā no dzīvnieku atbildes reakcijas ekspozīcijas laikā var noteikt biežākus novērojumus. Ja dzīvnieku novērošanu traucē dzīvnieku fiksācijas cauruļu izmantošana, vāji apgaismotas visa ķermeņa ekspozīcijas kameras vai neizgaismota atmosfēra, dzīvnieki ir uzmanīgi jānovēro pēc ekspozīcijas. Novērojumos pirms nākamās dienas ekspozīcijas var novērtēt toksiskās ietekmes atgriezeniskumu vai saasināšanos.

▼M4

32. Visus novērojumus reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

33. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādu, kā arī elpošanas, asinsrites, nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu. Pētījuma protokolā var ietvert papildu novērtējumus, piemēram, par kinētiku, biomonitoringu, plaušu funkciju, aizturētiem mazšķīstošiem materiāliem, kas uzkrājas plaušu audos, un uzvedības maiņām.

ĶERMEŅA SVARS

34. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē drīz pēc pirmās ekspozīcijas (0. diena), pēc tam divreiz nedēļā (piemēram, piektdienās un pirmdienās, lai parādītu atveseļošanos nedēļas nogalē, kurā nenotiek ekspozīcija, vai ar laika intervāliem, kas ļauj novērtēt sistēmisko toksicitāti) un nāves iestāšanās vai eitanāzijas brīdī. Ja pirmo divu nedēļu laikā netiek novērota nekāda ietekme, pārējā pētījuma laikā ķermeņa svaru var noteikt reizi nedēļā. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekus (ja tos izmanto) ir jāturpina svērt reizi nedēļā visā atveseļošanās periodā. Beidzot pētījumu, visi dzīvnieki ir jānosver neilgi pirms nonāvēšanas, lai nodrošinātu orgānu un ķermeņa svara attiecību objektīvu aprēķinu.

BARĪBAS UN ŪDENS PATĒRIŅŠ

35. Barības patēriņš ir jānosaka reizi nedēļā. Var noteikt arī ūdens patēriņu.

KLĪNISKĀ PATOLOĢIJA

36. Klīniskās patoloģijas novērtēšana ir jāveic visiem dzīvniekiem, arī kontroles un satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekiem, kad šos dzīvniekus nonāvē. Ir jāreģistrē laika intervāls starp ekspozīcijas beigām un asins parauga ņemšanu, it sevišķi, ja attiecīgais beigupunkts strauji atjaunojas. Parametriem ar īsu pussabrukšanas periodu plazmā (piemēram, *COHb*, *CHE* un *MetHb*) ir ieteicama paraugu ņemšana pēc ekspozīcijas pabeigšanas.

37. Turpmāk 1. tabulā ir uzskaitīti klīniskās patoloģijas parametri, kas parasti ir vajadzīgi visiem toksikoloģijas pētījumiem. Urīnanalīze parasti nav jāveic, bet to var veikt, ja to uzskata par lietderīgu, jo tiek prognozēta vai novērota toksicitāte. Lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, pētījuma vadītājs var izvēlēties novērtēt papildu parametrus (piemēram, holīnesterāzi, lipīdus, hormonus, skābju/bāzu līdzsvaru, methemoglobīnu vai Heinca ķermenīšus, kreatīnkināzi, mieloīdu/eritroīdu attiecību, troponīnus, arteriālo asiņu gāzes, laktātdehidrogenāzi, sorbitoldehidrogenāzi, glutamātdehidrogenāzi un gamma glutamiltranspeptidāzi).

▼M4

1. tabula

Klīniskās patoloģijas standartparametri

Hematoloģija	
Eritrocītu skaits	Kopējais leikocītu skaits
Hematokrīts	Diferenciālais leikocītu skaits
Hemoglobīna koncentrācija	Trombocītu skaits
Vidējais korpuskulārais hemoglobīns	Asins recētspēja (izvēlieties vienu):
Vidējais korpuskulārais tilpums	— protrombīna laiks
Vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija	— recēšanas laiks
Retikulocīti	— daļējais tromboplastīna laiks
Klīniskā ķīmija	
Glikoze (*)	Alanīna aminotransferāze
Kopējais holesterīns	Aspartāta aminotransferāze
Triglicerīdi	Alkalīnfosfatāze
Asins urīnvielas slāpeklis	Kālijs
Kopējais bilirubīns	Nātrijs
Kreatinīns	Kalcijs
Kopējais olbaltums	Fosfors
Albumīns	Hlorīds
Globulīns	
Urīnanalīze (pēc izvēles)	
Izskats (krāsa un duļķainība)	Kopējais olbaltums
Tilpums	Glikoze
Īpatnējais svars vai osmolalitāte	Asinis / asins šūnas
pH	

(*) Tā kā ilgstošs nebarošanas periods var apdraudēt testa dzīvnieku glikozes mērījumu objektivitāti salīdzinājumā ar kontroldzīvnieku glikozes mērījumiem, pētījuma vadītājam ir jānosaka, vai dzīvnieku nebarošana ir piemērota pieeja. Ja tiek izmantots nebarošanas periods, tam ir jābūt piemērotam izmantotajām sugām. Žurkai tas varētu būt 16 stundas (nebarošana uz nakti). Glikozi tukšā dūšā var noteikt pēc nakts nebarošanas perioda pēdējā ekspozīcijas nedēļā vai pēc nakts nebarošanas perioda pirms autopsijas (ja to nosaka pirms autopsijas, tas jādara kopā ar visiem pārējiem klīniskās patoloģijas parametriem).

38. Ja pastāv liecības, ka galvenā nogulsnēšanās un aiztures vieta ir elpošanas sistēmas lejasdaļa (t. i., alveolas), bronhoalveolāra lavāža (*BAL*) var būt piemērots paņēmiens, ar ko kvantitatīvi analizēt uz hipotēzi pamatotus devas un ietekmes parametrus, koncentrējot uzmanību uz alveolītu, plaušu iekaisumu un fosfolipidozi. Tas ļauj attiecīgi analizēt atbildes reakciju uz devu un alveolāro bojājumu pārmaiņas laika gaitā. *BAL* šķidrumu var analizēt, lai noteiktu leikocītu kopējo un diferenciālo skaitu, kopējo olbaltumu un laktātdehidrogenāzi. Vēl var aplūkot parametrus, kas liecina par lizosomu bojājumiem, fosfolipidozi, fibrozi un kairinošu vai alerģisku iekaisumu, sakarā ar kuru var noteikt arī iekaisuma reakciju veicinātājus citokīnus/hemokīnus. *BAL* mērījumi parasti papildina histopatoloģijas izmeklējumu rezultātus, bet nevar tos aizstāt. Norādījumi par plaušu lavāžas veikšanu pieejami *GD 39* (2).

▼M4

SMAGA PATOLOĢIJA UN ORGĀNU SVARS

39. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kas izņemti no pētījuma dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ, ir jāveic pilna atasiņošana (ja iespējams) un pilna autopsija. Ir jāreģistrē laiks starp katra dzīvnieka pēdējās ekspozīcijas beigām un eitanāziju. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsijas jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādām elpošanas sistēmas pārmaiņām.

40. Turpmāk 2. tabulā ir uzskaitīti orgāni un audi, kas pilnās autopsijas laikā ir jāsaglabā piemērotā līdzeklī histopatoloģisko izmeklējumu veikšanai. Lēmums par [iekavās] norādīto orgānu un audu konservēšanu, kā arī jebkādu citu orgānu un audu konservēšanu ir pētījuma vadītāja ziņā. **Treknrakstā** uzskaitītie orgāni ir jāatbrīvo no audiem un jānosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Vairogdziedzeris un sēklinieku piedēkļi jānosver tikai tādā gadījumā, ja tas vajadzīgs, jo atbrīvošana no artefaktiem var traucēt histopatoloģisku izvērtēšanu. Audu un orgānu fiksācija jāveic 10 % bufervielas formalīnā vai citā piemērotā fiksācijas šķīdumā tūlīt pēc autopsijas un ne mazāk kā 24–48 stundas pirms atbrīvošanas no audiem atkarībā no izmantotā fiksācijas šķīduma.

2. tabula

Orgāni un audi, ko konservē pilnas autopsijas laikā

Virsnieru dziedzeri	Sēklas pūslīši
Kaulu smadzenes (un/vai svaigs aspirāts)	Muguras smadzenes (kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	**Liesa**
[Acis (tīklene, acs nervs) un plakstiņi]	Kuņģis
Sirds	**Sēklinieki**
Nieres	**Tīms**
Balsene (trīs līmeņi, no tiem vienā līmenī uzgāmura pamatne)	Vairogdziedzeris
Aknas	Traheja (vismaz divi līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķērsgriezumu)
Plauša (visas daivas vienā līmenī, ar galvenajiem bronhiem)	[Urīnpūslis]
Plaušas vārtu limfmezgli, it sevišķi tādu testējamo ķīmisko vielu gadījumā, kas sastāv no mazšķīstošām daļiņām. Padziļinātiem izmeklējumiem un/vai pētījumiem, kuros uzmanība pievērsta imunoloģiskajiem aspektiem, var apsvērt, vai neņemt papildu limfmezglus, piemēram, limfmezglus no mediastinālā, kakla/zemžokļu un/vai aurikulārā apvidus.	Dzemde
	Visi makroskopiskie bojājumi
Aizdegunes audi (vismaz četri līmeņi; viens līmenis, kurā ietilpst aizdegunes kanāls un ar degunu saistītie limfātiskās sistēmas audi (*NALT*)).	
Barības vads	
[Ožas sīpols]	
Olnīcas	

▼M4

41. Lai saglabātu plaušu struktūru, tās jāizņem neskartas, jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksācijas šķīdumu spiedienā, ko rada 20–30 cm dziļš ūdens (5). Visu daivu, arī galveno bronhu, izgriezumi jāievāc vienā līmenī, bet, ja veic plaušu lavāžu, neskalotā daiva ir jāizgriež trijos līmeņos (tās nedrīkst būt sēriju sekcijas).

42. Aizdegunes audi ir jāizmeklē vismaz četros līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver aizdegunes kanāls (5, 6, 7, 8, 9), lai varētu pienācīgi izmeklēt plakano epitēliju, pārejas epitēliju (elpceļu bezskropstiņepitēliju), elpceļu epitēliju (elpceļu skropstiņepitēliju) un ožas epitēliju, un limfātiskie drenējošie audi (*NALT*; 10, 11). Balsene ir jāizmeklē trijos līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver uzgāmura pamatne (12). Ir jāizmeklē vismaz divi trahejas līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķērsgriezumu.

HISTOPATOLOĢIJA

43. Visu 2. tabulā uzskaitīto orgānu un audu histopatoloģiskā izvērtēšana jāizdara kontrolgrupai, augstākās koncentrācijas grupai, kā arī visiem dzīvniekiem, kas nobeidzas vai tiek nonāvēti pētījuma laikā. Īpaša uzmanība ir jāpievērš elpošanas sistēmai, mērķorgāniem un makroskopiskiem bojājumiem. Tie orgāni un audi, kuriem augstākās koncentrācijas grupā ir novēroti bojājumi, ir jāizmeklē visām grupām. Lai parādītu nepārprotamu atbildes reakciju uz koncentrāciju, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt histopatoloģisku izvērtēšanu papildu grupām. Ja izmanto satelītgrupu (atgriezeniskuma grupu), histopatoloģiskā izvērtēšana ir jāizdara visiem audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme. Ja augstākās koncentrācijas grupā ir novērots pārmērīgi daudz agrīnas nobeigšanās gadījumu vai citas problēmas, kas mazina datu būtiskumu, ir histopatoloģiski jāizmeklē nākamā zemāka koncentrācijas līmeņa grupa. Jāmēģina rast korelāciju starp pilnas autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

44. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka ķermeņa svaru, barības patēriņu, klīnisko patoloģiju, smagu patoloģiju, orgānu svaru un histopatoloģiju. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kuri izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi. Gan kvantitatīvie, gan papildu rezultāti ir jānovērtē ar attiecīgu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.

Testēšanas pārskats

45. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

— apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,

▼M4

— izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka. Var norādīt avotu un vēsturiskos datus, ja tie ir par dzīvniekiem, kas pakļauti tādai pašai ekspozīcijai, turēšanas apstākļiem un nebarošanas režīmiem,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— nejaušināšanas metode,

— jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),

— identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (*CAS*), ja zināms.

Nesējviela:

— nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),

— vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

— inhalācijas kameras sīks apraksts, ieskaitot tilpumu un shēmu,

— dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,

— temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,

— kondicionēšanai izmantotais gaisa avots un sistēma,

— metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,

— spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),

— ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta kamerā (visa ķermeņa ekspozīcija),

— testa atmosfēras stabilitāte,

— temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,

— pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde,

— gaisa caurplūduma rādītāji: gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniekslodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),

— laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),

— tilpuma nomaiņu skaits stundā,

— mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

— pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,

▼M4

— nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,

— visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (mg/l, mg/m^3 utt.), nevis tilpuma vienībās (ppm, ppb utt.),

— daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (*MMAD*) un ģeometriskā standartnovirze (σ_g), arī to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķas daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai,

— apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un dzīvniekus pakļauj tās iedarbībai,

— apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai uzraudzītu kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu (t. i., kalibrēšanas līknes attīstība),

— apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai paņemtu paraugus nolūkā noteikt koncentrāciju kamerā un daļiņu sadalījumu pēc lieluma,

— sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),

— metode, ar kādu ir nejaušināti izraudzīti dzīvnieki testa un kontroles grupām,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),

— testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

— tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,

— tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,

— tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un *MMAD* un σ_g aprēķinus,

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),

▼M4

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka svaru,

— tabula ar datiem par barības patēriņu,

— tabula ar klīniskās patoloģijas datiem,

— katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,

— tabula ar jebkādiem citiem parametriem, kas tikuši mērīti.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

— īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,

— ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,

— pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,

— jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs),

— jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,

— jānorāda mērķorgāns(-i),

— jānosaka *NOAEL* un *LOAEL*.

LITERATŪRA

(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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼**M4**

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼B

B.9. **ATKĀRTOTĀS DEVAS (28 DIENU) TOKSICITĀTE (ĀDAS)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļas A iedaļu.

1.2. DEFINITIONS

Skatīt vispārīgā ievada B daļas B iedaļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielu dažādās devās katru dienu 28 dienu laikā uztriepj uz ādas vairāku grupu izmēģinājumu dzīvniekiem; vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Vielas pielietošanas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Pārbaudes laikā mirušos dzīvniekus secē, beidzoties pārbaudei, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Dzīvniekus pirms testa vismaz piecas dienas pieradina pie izmitināšanas un barošanas apstākļiem. Veselus un jaunus dzīvniekus pirms testa pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Neilgi pirms testa nocērp apmatojumu uz izmēģinājumu dzīvnieku muguras. Ādu var arī noskūt, bet tas jādara 24 stundas pirms testa. Parasti cirpšanu vai skūšanu apmēram ik pēc nedēļas atkārto. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu. Testa vielas uzlikšanai jāsagatavo ne mazāk kā 10 % no ķermeņa virsmas. Lemjot par to, cik lielai ādas virsmai jābūt brīvai no apmatojuma, lai to apstrādātu ar vielu, ņem vērā dzīvnieku svaru. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, testa viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu nesēju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Testa šķidrumus parasti neatšķaida. Parasti vielu pielieto vienreiz dienā piecas līdz septiņas dienas nedēļā.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Var izmantot pieaugušas žurkas, trušus vai jūrascūciņas. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet šī izvēle jāpamato.

▼B

Uzsākot testus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara.

1.6.2.2. *Dzīvnieku skaits un dzimums*

Vienu un to pašu devas līmeni izmanto vismaz 10 (pieciem sieviešu un pieciem vīriešu dzimuma) dzīvniekiem ar veselu ādu. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nogalināti testa gaitā. Turklāt 10 dzīvnieku papildu grupai (pieci katra dzimuma dzīvnieki) var ievadīt augsta līmeņa devu 28 dienas un novērot 14 dienas pēc vielas ievadīšanas attiecībā uz toksisko ietekmju atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos. Izmanto arī 10 kontroles dzīvnieku papildu grupu (piecus katra dzimuma dzīvniekus).

1.6.2.3. *Izmantotās devas*

Jāizmanto vismaz trīs devas, kā arī jābūt kontrolei, un, ja lieto nesēju, kontroles dzīvniekiem jāsaņem tikai nesējs. Iedarbības laikam jābūt vismaz sešas stundas dienā. Testa vielu pielieto katru dienu vienādā laikā un devas periodiski pielāgo (ik pēc nedēļas vai divām nedēļām), lai tās būtu nemainīgas attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru. Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testa vielu. Ja izmanto nesēju, kas atvieglo dozēšanu, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu nesēja kā dzīvnieki, kuri saņem lielāko testa vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst izraisīt toksiskuma pazīmes. Ja pieejami provizoriskie dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. To dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski novērtēt rezultātus.

Ja testa vielas lietošana izraisa smagu ādas kairinājumu, tās koncentrācija jāsamazina, un tāpēc var samazināties vai neizpausties citas toksiskas reakcijas, lietojot lielo devu. Turklāt, ja āda ir nopietni bojāta, var gadīties, ka ir jāpārtrauc tests un jāizvēlas mazāka koncentrācija.

1.6.2.4. *Pieļaujamības tests*

Ja iepriekšējā pārbaudē izmanto 1 000 mg/kg devu vai vēl lielāku devu, kas atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki, ja tāda ir zināma, un nenovēro toksisku ietekmi, var uzskatīt, ka turpmākā pārbaude nav nepieciešama.

1.6.2.5. *Novērošanas laika posms*

Izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi un laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

▼B

1.6.3. **Procedūra**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Dzīvnieki parasti saņem testa vielu septiņas dienas nedēļā 28 dienu laikā. Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzēti tālākai novērošanai, turpmākās 14 dienas nesaņem testa vielu, lai varētu izsekot tam, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība. Iedarbības ilgums ir vismaz sešas stundas dienā.

Testa vielu vienmērīgi uztriepj uz ādas, kuras platība veido apmēram 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamās ādas laukumu var samazināt, bet tam jābūt pietiekami lielam, un viela jāuztriepj pēc iespējas plānāk un vienmērīgāk.

Testa vielas saskari ar ādu iedarbības laikā nodrošina ar poraina marles pārsēja un nekairinoša plākstera palīdzību. Apstrādātā vieta pēc tam vēl jāpārklāj tā, lai nostiprinātu marles pārsēju ar testa vielu un lai dzīvnieki nevarētu to norīt. Lai testa viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nav ieteicama. Kā alternatīvu var izmantot apkakles veida aizsargierīci.

Beidzoties iedarbības laikam, testa vielas atlikumu, ja iespējams, noņem ar ūdeni vai izmanto kādu citu piemērotu ādas notīrīšanas paņēmienu.

Visus dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, to parādīšanās brīdi, smaguma pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu un apmatojumu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Dzīvnieki katru nedēļu jānosver. Ieteicams arī katru nedēļu noteikt barības patēriņu. Sistemātiska dzīvnieku novērošana ļauj testa laikā novērst dzīvnieku zudumus kanibālisma, audu autolīzes vai nepiemērotu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir stipra baiļu sajūta vai sāpes, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina, un jāizdara autopsija.

Testa beigās visiem dzīvniekiem, arī kontroles dzīvniekiem, veic šādas pārbaudes:

1) hematoloģiskās pārbaudes, kas paredz vismaz hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocitārās formulas noteikšanu, kā arī asins recēšanas mērījumus;

2) klīnisko asins bioķīmiju, tai skaitā vismaz vienu aknu un nieru funkcijas parametru: seruma alanīna aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnpirovīnogskābes transamināze), seruma aspartāta aminotransferāzes (agrāk pazīstama kā glutamīnskābeņetiķskābes transamināze), urīnvielas slāpekļa, albumīna, asins kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma proteīnu mērījumus.

Citas analīzes, kas var būt nepieciešamas pienācīgai toksikoloģiskai novērtēšanai, paredz kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, tukšas dūšas glikozes, lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu.

▼B

Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu vielas novēroto ietekmi.

1.6.4. **Autopsija**

Visiem izmēģinājumu dzīvniekiem veic pilnu autopsiju. Vismaz aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, lai novērstu sažūšanu. Orgāni un audi, proti, vesela un apstrādāta āda, aknas, nieres, liesa, sēklinieki, virsnieru dziedzeri, sirds un mērķorgāni (orgāni, kuros novēroti makroskopiski bojājumi vai izmaiņas izmēros), jāsaglabā piemērotā vidē turpmākai histopatoloģiskai izmeklēšanai.

1.6.5. **Histopatoloģiskā izmeklēšana**

Histoloģiski izmeklē saglabātos orgānus un audus, kas iegūti no lielās devas grupas un no kontroles grupas dzīvniekiem. Ja testa viela lielākajā devā rada bojājumus orgānos un audos, tie jāizmeklē arī visiem pārējiem mazāku devu saņēmušo grupu dzīvniekiem. Histoloģiski izmeklējot papildu grupas dzīvniekus, īpašu uzmanību pievērš tiem orgāniem un audiem, kuros novērotas toksiskuma pazīmes pārējās grupās pēc apstrādes.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā grupā testa sākumā un to dzīvnieku skaitu, kam ir novēroti vienādi bojājumi.

Visi iegūtie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par dzīvniekiem (suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.),

— testa apstākļi (iekļaujot pārsēja veidu – okluzīvs vai neokluzīvs),

— devu līmeņi (jānorāda arī nesējs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— netoksiskas devas līmenis, ja var noteikt,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— nāves iestāšanās brīdis testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiska vai cita ietekme,

— katras anomālas pazīmes parādīšanās brīdis un tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

▼B

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļas D iedaļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļas E iedaļu.

▼M7

B.10. ZĪDĪTĀJU *IN VITRO* HROMOSOMĀLO ABERĀCIJU TESTS

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 473 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

In vitro hromosomālo aberāciju testa mērķis ir identificēt ķimikālijas, kas zīdītāju šūnu kultūrās rada strukturālas hromosomu aberācijas (2) (3) (4). Var būt divu veidu strukturālās aberācijas — hromosomu vai hromatīdu. Hromosomālo aberāciju *in vitro* testos var rasties poliploīdija (tostarp endoreduplikācija). Kaut arī poliploīdiju var izraisīt aneigēni, poliploīdija viena pati neliecina par aneigēnu potenciālu un var vienkārši liecināt par šūnas cikla perturbāciju vai citotoksicitāti (5). Šis tests nav veidots tā, lai mērītu aneiploīdiju. Aneiploīdijas detektēšanai ieteicams veikt *in vitro* mikrokodolu testu (6).

In vitro hromosomālo aberāciju testam var izmantot cilvēka vai grauzēja izcelsmes šūnu līniju kultūras vai primāro šūnu kultūras. Izmantojamās šūnas jāizvēlas pēc to spējas augt kultūrā, kariotipa stabilitātes (tostarp hromosomu skaita) un hromosomu aberāciju spontānā biežuma (7). Šobrīd pieejamie dati neļauj sniegt konkrētus ieteikumus, taču dod pamatu domāt, ka ķīmiskā apdraudējuma izvērtēšanā ir svarīgi ņemt vērā testēšanai izvēlēto šūnu *p53* statusu, ģenētisko (kariotipa) stabilitāti, DNS reparācijas spēju un izcelsmi (grauzējs vai cilvēks). Tāpēc, zināšanām šajā jomā aizvien paplašinoties, šīs testēšanas metodes lietotāji tiek mudināti ņemt vērā, kādu ietekmi šīs un citas šūnu īpatnības atstāj uz šūnu līnijas lietderību hromosomu aberāciju indukcijas detektēšanā.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Ja vien šūnas attiecībā uz testējamām ķimikālijām nav metaboliski kompetentas, *in vitro* testos parasti jāizmanto eksogēns metaboliskās aktivācijas avots. Eksogēnā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi. Jāievēro piesardzība, lai izvairītos no apstākļiem, kas varētu radīt artefaktiski pozitīvus rezultātus, t. i., hromosomas bojājumiem, ko nerada tieša mijiedarbība starp testējamām ķimikālijām un hromosomām; tādi apstākļi ietver pH vai osmolalitātes izmaiņas (8) (9) (10), mijiedarbību ar barotnes komponentiem (11) (12) vai pārmērīgus citotoksicitātes līmeņus (13) (14) (15) (16).

Šo testu izmanto, lai detektētu hromosomu aberācijas, kas varētu rasties no klastogēniem notikumiem. Hromosomu aberācijas indukcijas analīze jāveic, izmantojot šūnas metafāzē. Tādēļ ir būtiski, lai šūnas gan apstrādātajās, gan neapstrādātajās kultūrās sasniegtu mitozi. Attiecībā uz ražotiem nanomateriāliem šo testēšanas metodi var būt nepieciešams īpaši pielāgot, bet šajā testēšanas metodē tas nav aprakstīts.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

▼M7

TESTA PRINCIPS

Cilvēka vai citu zīdītāju izcelsmes šūnu kultūras eksponē testējamajai ķimikālijai gan ar eksogēnu metaboliskās aktivācijas avotu, gan arī bez tā, ja vien nelieto šūnas ar adekvātu metabolisko kapacitāti (sk. 13. punktu). Pienācīgos iepriekšnoteiktos laika intervālos pēc šūnu kultūru sākotnējās ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai tās apstrādā ar kādu metafāzi apturošu ķimikāliju (piemēram, kolcemīdu vai kolhicīnu), šūnas metafāzē savāc, iekrāso un mikroskopiski analizē uz hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijām.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Šūnas

Var izmantot dažādas šūnu līnijas (piemēram, Ķīnas kāmja olnīcu (CHO), Ķīnas kāmja plaušu V79, Ķīnas kāmja plaušu (CHL)/IU, TK6) līnijas vai primārās šūnu kultūras, tostarp cilvēku vai citu zīdītāju perifērisko asiņu limfocītus (7). Šūnu līniju izvēle zinātniski jāpamato. Izmantojot primārās šūnas, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ, ja iespējams, jāapsver cilvēku izcelsmes primāro šūnu izmantošana un paraugošana jāveic saskaņā ar humāniem ētikas principiem un noteikumiem. Cilvēka perifērisko asiņu limfocīti jāiegūst no jauniem (aptuveni 18–35 gadu veciem) nesmēķētājiem, kuriem nav zināmu slimību un kuri pēdējā laikā nav bijuši eksponēti genotoksiskiem faktoriem (piemēram, ķimikālijām, jonizējošajam starojumam) tādā apmērā, kas palielinātu hromosomu aberāciju fona līmeni. Tas nodrošinātu, ka hromosomu aberāciju fona līmenis ir zems un nemainīgs. Palielinoties vecumam, hromosomu aberāciju fona līmenis palielinās, un sievietēm šī tendence novērojama izteiktāk nekā vīriešiem (17) (18). Ja izmanto šūnas no vairāk nekā viena donora, jānorāda donoru skaits. Jāpierāda, ka šūnas kopš to apstrādes sākšanas ar testējamo ķimikāliju līdz šūnu paraugošanai ir dalījušās. Šūnu kultūras uztur šūnu eksponenciālas augšanas fāzē (šūnu līnijas) vai stimulē dalīties (limfocītu primārās kultūras), lai šūnas eksponētu dažādos šūnas cikla posmos, jo konkrētu šūnas attīstības posmu jutība pret testējamo ķimikāliju var nebūt zināma. Primārās šūnas, kuras dalīšanās nolūkos jāstimulē ar mitogēnām vielām, parasti vairs nesinhronizē, kamēr tās eksponē testējamai ķimikālijai (piemēram, cilvēka limfocīti pēc 48 stundu mitogēnās stimulācijas). Kamēr norit apstrāde ar testējamo ķimikāliju, izmantot sinhronizētas šūnas nav ieteicams, taču tas var būt pieņemami, ja tiek pamatots.

Barotne un kultivēšanas apstākļi

Kultūru uzturēšanai lieto piemērotas barotnes un ievēro atbilstošus inkubācijas apstākļus (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar 5 % CO_2 koncentrāciju, ja nepieciešams, 37 °C inkubācijas temperatūra). Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda modālā hromosomu skaita stabilitāte un jāpārliecinās, ka nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu (7) (19), un šūnas nedrīkst izmantot, ja konstatē mikoplazmu vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu līniju vai primāro kultūru normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem (20).

Kultūru sagatavošana

Šūnu līnijas: šūnas pavairo no pamatkultūrām, ko barotnē uzsēj tādā blīvumā, lai kultūras suspensijās vai monoslānī līdz šūnu savākšanai eksponenciāli augtu piemēram, jāizvairās no monoslānī augošu šūnu konfluences).

▼M7

Limfocīti: nesadalītas asinis, kas apstrādātas ar antikoagulantu (piem., heparīnu), vai tikai limfocītus kultivē (piem., 48 stundas cilvēka limfocītu gadījumā) mitogēna klātbūtnē [piem., cilvēka limfocītu gadījumā — fitohemaglutinīna (*PHA*) klātbūtnē], lai pirms šūnu eksponēšanas testējamai ķimikālijai inducētu to dalīšanos.

Metaboliskā aktivācija

Ja izmanto šūnas ar nepietiekamu endogēno metabolisko kapacitāti, jālieto eksogēnas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piemēram, *Aroclor 1254* (21) (22) (23) vai fenobarbitālu kombinācijā ar β-naftoflavonu (24) (25) (26) (27) (28) (29). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (30) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat efektīva kā *Aroclor 1254* (24) (25) (26) (28). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē to var palielināt līdz 10 % (tilp./tilp.). Apstrādes laikā jāizvairās no tādu produktu izmantošanas, kas samazina mitotisko indeksu, jo īpaši kalcija kompleksveidošanas produktiem (31). Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķimikāliju klase.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo atbilstošos šķīdinātājos un, ja vajadzīgs, pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 23. punktu). Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas jātestē ar attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (32) (33) (34). Testējamās ķimikālijas preparāti jāsagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātāji

Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķimikālijas šķīdību, šķīdinātājam neatstājot negatīvu ietekmi uz testa norisi — nemainot šūnu augšanu, neietekmējot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metabolisko aktivāciju utt. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantot šķīdinātāju (vai barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji, piemēram, ir ūdens vai dimetilsulfoksīds. Parasti organiskajiem šķīdinātājiem nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.) un šķīdinātājiem uz ūdens bāzes (sālsūdens vai ūdens) nevajadzētu pārsniegt 10 % (tilp./tilp.) galīgajā apstrādes barotnē. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamām ķimikālijām, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja to apliecinošu datu nav, ir svarīgi izmantot neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), lai pierādītu, ka izvēlētais šķīdinātājs nerada nekādu kaitīgu vai klastogēnu ietekmi.

Šūnu savairošanās un citotoksicitātes mērīšana un apstrādes koncentrāciju izvēle

Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizvēlas koncentrācijas, kas spēj radīt artefaktiski pozitīvas atbildreakcijas, piemēram, tādas koncentrācijas, kas izraisa pārmērīgu citotoksicitāti (sk. 22. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 23. punktu) vai manāmi izmaina pH vai osmolalitāti (sk. 5. punktu). Ja testējamā

▼M7

ķimikālija pievienošanas brīdī ievērojami izmaina barotnes pH, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu, lai izvairītos no artefaktiski pozitīviem rezultātiem un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus.

Lai nodrošinātu, ka pietiekams skaits apstrādāto šūnu testa laikā ir sasniegušas mitozi un ka apstrāde tiek veikta attiecīgā citotoksicitātes līmenī (sk. 18. un 22. punktu), mēra šūnu savairošanos. Citotoksicitāti nosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisko aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu nāves un augšanas rādītājus. Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var palīdzēt sekmīgāk noteikt galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Ja to veic, tas nedrīkst aizstāt citotoksicitātes mērījumu galvenajā eksperimentā.

Piemērotas metodes citotoksicitātes novērtēšanai citoģenētiskajos testos ir populācijas relatīvā dubultošanās jeb divkāršošanās (*RPD*) vai šūnu skaita relatīvais pieaugums (*RICC*) (13) (15) (35) (36) (55) (sk. formulas 2. papildinājumā). Ja apstrāde norit ilgi un paraugošanas laiki pēc apstrādes sākuma vairāk nekā 1,5 reizes pārsniedz normālo šūnas cikla garumu (t. i., kopumā pārsniedz 3 šūnas ciklu garumu), *RPD* var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu (37). Tādos apstākļos piemērotāks rādītājs varētu būt *RICC* vai, ja izmanto *RPD*, noderīgu aplēsi sniegtu citotoksicitātes izvērtēšana pēc 1,5 normāliem šūnas cikliem.

Attiecībā uz limfocītiem primārajās kultūrās, kaut arī mitotiskais indekss (MI) ir citotoksiskās/citostatiskās ietekmes rādītājs, tas ir atkarīgs no laika, kas pagājis pēc apstrādes, no izmantotā mitogēna un iespējamiem šūnas cikla traucējumiem. Tomēr MI ir pieņemams, jo citu citotoksicitātes mērījumu veikšana var būt apgrūtinoša un nepraktiska un tie var nebūt piemērojami limfocītu mērķpopulācijai, kas aug, reaģējot uz *PHA* stimulāciju.

Kaut arī ieteicamie citotoksicitātes parametri šūnu līnijām ir *RICC* un *RPD*, bet limfocītu primārajām kultūrām — MI, lietderīgu papildinformāciju var sniegt arī citi rādītāji (piem., šūnu integritāte, apoptoze, nekroze, šūnas cikls).

Jāizvērtē vismaz trīs testējamās koncentrācijas (neietverot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (pienācīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Neatkarīgi no šūnu veidiem (šūnu līnijas vai limfocītu primārās kultūras) katrā no testētajām koncentrācijām drīkst izmantot vienu vai vairākas (replikāti) apstrādātas kultūras. Kaut arī ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ir pieņemami izmantot arī vienu kultūru, ja vien gan vienas kultūras, gan duplikatīvo kultūru gadījumā tiek novērtēts tāds pats kopējais šūnu skaits. Vienas kultūras izmantošana ir īpaši aktuāla, ja vērtē vairāk nekā 3 koncentrācijas (sk. 31. punktu). Rezultātus, kas pie konkrētas koncentrācijas iegūti no neatkarīgām replikātkultūrām, datu analīzei var apkopot (38). Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas uzrāda nelielu citotoksicitāti vai nav citotoksiskas, parasti piemēroti

▼M7

ir koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes rašanās gadījumā izraudzītajām testējamām koncentrācijām jāaptver gan tās, kuras rada citotoksicitāti, kā aprakstīts 22. punktā, gan koncentrācijas, kuras rada vidēju un nelielu citotoksicitāti vai to nerada vispār. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijas–atbildreakcijas līkne un, lai iegūtu datus pie zemas un mērenas citotoksicitātes vai sīki izpētītu devas–atbildreakcijas sakarību, būs jāizmanto savstarpēji tuvāk esošas koncentrācijas un/vai vairāk nekā trīs koncentrācijas (viena kultūra vai replikāti), jo īpaši situācijās, kad eksperiments ir jāatkārto (sk. 47. punktu).

Ja maksimālā koncentrācija ir balstīta uz citotoksicitāti, ar augstāko koncentrāciju jācenšas panākt 55 ± 5 % citotoksicitāti, izmantojot ieteiktos citotoksicitātes parametrus (t. i., *RICC* un *RPD* samazinājumu šūnas līnijām un MI samazinājumu limfocītu primārajām kultūrām līdz 45± 5 % no paralēlās negatīvās kontroles). Interpretējot pozitīvos rezultātus, kas atrodami vienīgi šā 55 ± 5 % citotoksicitātes diapazona augšgalā (13), jāievēro piesardzība.

Mazšķīstošām testējamām ķimikālijām, kuras nav citotoksiskas pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja iegūtā citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, ka augstāka par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīm redzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Pie koncentrācijas, kas rada nogulsnes, īpaši jācenšas nodrošināt, lai nogulsnes netraucētu testa norisi (piem., iekrāsošanu vai novērtēšanu). Pirms eksperimenta var būt lietderīgi noteikt šķīdību barotnē.

Ja netiek novērotas nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte, visaugstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (39) (40) (41). Ja testējamajai ķimikālijai nav noteikta sastāva, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģisks materiāls (*UVCB*) (42), no vides ekstrahēts produkts u. c., lai palielinātu katra komponenta koncentrāciju, visaugstākajai koncentrācijai, iespējams, vajadzēs būt vēl lielākai (piem., 5 mg/ml), ja nav pietiekamas citotoksicitātes. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (43).

Kontroles

Paralēlās negatīvās kontroles (sk. 15. punktu) — šķīdinātāju apstrādes barotnē — iekļauj par katru šūnu ievākšanas reizi, un ar tām rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes kultūrām.

Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt klastogēnus izmantotā testa protokola apstākļos un attiecīgā gadījumā eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti. Pozitīvo kontroļu piemēri ir sniegti tālāk 1. tabulā. Pamatotos gadījumos var izmantot alternatīvas pozitīvās kontroles ķimikālijas. Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti, pozitīvās kontroles var izmantot vien attiecībā uz klastogēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Ja vien tas tiek veikts paralēli ar testu bez aktivācijas un apstrādes ilgums ir vienāds, šī viena pozitīvās kontroles atbildreakcija pierāda gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Taču attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi (bez S9) jānodrošina atsevišķas pozitīvās kontroles, jo apstrādes ilgums atšķirsies no testa, kurā izmantota metaboliskā aktivācija. Katra pozitīvā kontrole jāizmanto pie vienas vai vairākām koncentrācijām, ar kurām paredzēts radīt reproducējamus un detektējamus pieaugumus virs fona līmeņa, lai parādītu testa sistēmas jutību (t. i., ietekme ir skaidri redzama, taču nolasītājs nevar uzreiz atklāt kodēto priekšmetstikliņu identitāti), un atbildreakciju nedrīkst traucēt testēšanas metodē noteikto citotoksicitātes robežu pārsniegumi.

▼M7

1. tabula

Standartķimikālijas, kuras ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanā un pozitīvo kontroļu atlasē

Kategorija	Ķimikālija	*CAS* Nr.
1. Klastogēni, kuriem metaboliskā aktivācija nav vajadzīga		
	Metilmetānsulfonāts	66-27-3
	Mitomicīns C	50-07-7
	4-4-nitrohinolīn-N-oksīds	56-57-5
	Citozīnarabinozīds	147-94-4
2. Klastogēni, kam metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
	Benz(a)pirēns	50-32-8
	Ciklofosfamīds	50-18-0

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķimikāliju

Šūnas, kas vairojas, apstrādā ar testējamo ķimikāliju gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās.

Kultūru ievākšanas laiks

Lai veiktu pilnīgu izvērtēšanu, kas būtu vajadzīga, lai secinātu, ka rezultāts ir negatīvs, jāizpilda visi trīs turpmāk norādītie eksperimentālie nosacījumi, veicot īstermiņa apstrādi gan ar metabolisko aktivāciju, gan bez tās un ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas (sk. 43., 44. un 45. punktu):

— šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai bez metaboliskās aktivācijas, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli (18),

— šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai ar metabolisko aktivāciju, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli (18),

— šūnas nepārtraukti eksponē bez metaboliskās aktivācijas līdz paraugošanai, ko veic tad, kad apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli. Dažas ķimikālijas (piemēram, nukleozīdu analogi) var būt vieglāk detektējamas, ja apstrādes/paraugošanas laiks pārsniedz 1,5 normālos šūnas ciklus (24).

Gadījumos, kad kāds no iepriekš norādītajiem eksperimentālajiem nosacījumiem rada pozitīvu atbildreakciju, nav vajadzības veikt pētījumus ar pārējiem apstrādes režīmiem.

Hromosomu sagatavošana

Šūnu kultūras 1–3 stundas pirms ievākšanas apstrādā ar kolcemīdu vai kolhicīnu. Hromosomu sagatavošanai paredzētās šūnu kultūras ievāc un apstrādā katru atsevišķi. Hromosomu sagatavošana ietver šūnu hipotonisku apstrādi, fiksāciju un iekrāsošanu. Monoslāņa kultūrās 3–6 stundu apstrādes beigās var būt mitotiskās šūnas (ko var atpazīt pēc tā, ka tās ir apaļas un atdalās no virsmas). Tā kā

▼M7

mitotiskās šūnas viegli atdalās, tās var tikt nejauši aizvāktas kopā ar testējamo ķimikāliju saturošo barotni. Ja konstatē mitotisko šūnu skaita būtisku pieaugumu salīdzinājumā ar kontrolēm, kas norāda uz ticamu mitozes apstāju [*mitotic arrest*], šīs šūnas centrifugējot jāsavāc un jāievieto atpakaļ kultūrās, lai izvairītos no mitozes fāzes un hromosomu aberācijas riska šūnu zuduma ievākšanas laikā.

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, arī pozitīvās un negatīvās kontroles priekšmetstikliņi pirms mikroskopiskās analīzes, kurā konstatē hromosomu aberācijas, neatkarīgi jākodē. Tā kā fiksācijas procedūrā bieži rodas metafāzes šūnas, kas zaudējušas hromosomas, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vienādam ar modālo skaitu +/- 2.

Lai secinātu, ka testējamā ķimikālija ir viennozīmīgi negatīva, pie katras koncentrācijas un katrā kontrolē jānovērtē vismaz 300 labi izkliedētu šūnu metafāzē (sk. 45. punktu). Gadījumos, kad tiek izmantotas replikātkultūras, 300 šūnām jābūt līdzīgi sadalītām pa replikātiem. Ja uz katru koncentrāciju tiek izmantota viena kultūra (sk. 21. punktu), šajā vienā kultūrā jānovērtē vismaz 300 labi izkliedētu šūnu metafāzē. 300 šūnu novērtēšana uzlabo testa statistisko jaudu, turklāt tad retāk novērojamas nulles vērtības (paredzams, ka tikai 5 %) (44). Novērtējamo metafāzes šūnu skaitu var samazināt, ja tiek novērots liels skaits šūnu ar hromosomu aberācijām un testējamā ķimikālija tiek uzskatīta par viennozīmīgi pozitīvu.

Jāvērtē šūnas ar strukturālu(-ām) hromosomu aberāciju(-ām), ieskaitot un neieskaitot pārtraukumus. Pārrāvumi un pārtraukumi ir definēti 1. papildinājumā saskaņā ar (45) (46). Hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē apakštipos (pārrāvumi, apmaiņas). Laboratorijā izmantotajām procedūrām jānodrošina, ka hromosomu aberāciju analīzi veic apmācīti vērtētāji un attiecīgā gadījumā to profesionālizvērtē.

Kaut arī testa mērķis ir detektēt hromosomu strukturālas aberācijas, ir jāreģistrē poliploīdijas un endoreduplikācijas biežums, ja šīs parādības tiek novērotas. (Sk. 2. punktu.)

Laboratorijas kompetence

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jāveic virkne eksperimentu ar pozitīvās kontroles standartķimikālijām, kurām ir dažādi iedarbības mehānismi, un dažādām negatīvām kontrolēm (izmantojot dažādus šķīdinātājus/nesējus). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāatbilst literatūrai. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 37. punktā.

Lai pierādītu kompetenci detektēt klastogēniskās ķimikālijas un noteiktu metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti, pozitīvās kontroles ķimikāliju izlase (sk. 1. tabulu 26. punktā) jāpēta ar īsām un garām apstrādēm bez metaboliskās aktivācijas un ar īsu apstrādi ar metabolisko aktivāciju. Atlasīto ķimikāliju koncentrāciju klāsts jāizvēlas tā, lai radītu reproducējamus un ar koncentrācijām saistītus pieaugumus virs fona līmeņa un parādītu testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu.

▼M7

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Laboratorijā jānosaka:

— vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisko negatīvo (neapstrādāto, šķīdinātāja) kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās (44) (47). Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu bāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tā sastāvētu no vismaz 20 eksperimentiem, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta" (44), laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (48)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (47).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

Negatīvo kontroļu datos jāietver informācija par to, cik bieži vienīgajā kultūrā vai visās replikātkultūrās kopā sastopamas šūnas ar hromosomu aberācijām, kā aprakstīts 21. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturiskās negatīvo kontroļu datu bāzes sadalījuma kontroles robežās (44) (47). Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 37. punktu) un ka nav pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izklāsts

Jāizvērtē šūnu ar strukturālu(-ām) hromosomu aberāciju(-ām) īpatsvars. Hromatīdas tipa un hromosomas tipa aberācijas, kas klasificētas pēc apakštipa (pārrāvumi, apmaiņas) jāuzskaita atsevišķi, norādot to skaitu un biežumu eksperimenta un kontrolkultūrās. Pārtraukumus uzskaita un norāda atsevišķi, bet kopējā aberāciju biežumā neiekļauj. Ziņo par poliploīdijas un/vai endoreduplicētu šūnu īpatsvaru, ja tādas tiek novērotas.

Reģistrē paralēli veiktos citotoksicitātes mērījumus visās apstrādātajās kultūras, negatīvajās un pozitīvajās kontrolkultūrās galvenajā(-os) aberāciju noteikšanas eksperimentā(-os).

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemšanas pamatā ir šādi kritēriji:

— paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 39. punktā,

▼M7

— paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 26. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,

— šķīdinātāja kontrolē ir izpildīti šūnu savairošanās kritēriji (17. un 18. punkts),

— ir testēti visi trīs eksperimentālie nosacījumi, ja vien vienam no tiem nav bijis pozitīvs rezultāts (sk. 28. punktu),

— analizējams ir bijis pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits (31. un 21. punkts),

— maksimālās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 22., 23. un 24. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja kādā no izvērtētajiem eksperimentālajiem nosacījumiem (sk. 28. punktu):

a) vismaz vienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

b) minēto palielinājumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu,

c) kādi rezultāti ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma; sk. 39. punktu).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomas aberācijas kultivētajās zīdītāju šūnās. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (49) (50) (51).

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos (sk. 28. punktu):

a) nevienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

b) ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,

c) visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma; sk. 39. punktu).

Testējamo ķimikāliju šajā testa sistēmā tad uzskata par nespējīgu inducēt hromosomas aberācijas kultivētās zīdītāju šūnās.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne viennozīmīgi negatīva, ne viennozīmīgi pozitīva, kā aprakstīts iepriekš, vai lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp koncentrācijām, citus metaboliskās aktivācijas apstākļus (t. i., S9 koncentrāciju vai S9 izcelsmi)).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka atbildreakcija uz testējamo ķimikāliju nav skaidra.

▼M7

Poliploīdo šūnu skaita palielināšanās var norādīt uz to, ka testējamā ķimikālija, iespējams, inhibē mitotiskos procesus un izraisa skaitliskas hromosomu aberācijas (52). Šūnu ar endoreduplicētām hromosomām skaita palielināšanās var norādīt uz to, ka testējamai ķimikālijai, iespējams, piemīt potenciāls inhibēt šūnas cikla norisi (53) (54) (sk. 2. punktu). Tāpēc atsevišķi jāreģistrē poliploīdo šūnu un šūnu ar endoreduplicētām hromosomām sastopamība.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja tā zināma,

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija tika pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izvēles pamatojums;

— jānorāda arī šķīdinātāja īpatsvars galīgajā barotnē.

Šūnas:

— šūnu tips un avots,

— izmantoto šūnu kariotipa īpatnības un piemērotība,

— šūnu līnijām — mikoplazmas neesība,

— šūnu līnijām — informācija par šūnas cikla garumu, dubultošanās laiks vai proliferācijas indekss,

— asins donoru dzimums, vecums un visa relevantā informācija par donoru, nesadalītas asinis vai atdalīti limfocīti, izmantotais mitogēns,

— šūnu līnijām — ja pieejams, pasāžu jeb pārsējumu skaits,

— šūnu līnijām — šūnu kultūru uzturēšanas metodes,

— šūnu līnijām — modālais hromosomu skaits.

▼**M7**

Testēšanas apstākļi:

— metafāzes apturēšanai izmantojamās ķimikālijas identitāte, tās koncentrācija un šūnu ekspozīcijas ilgums,

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija barotnē (piem., barotnes μg vai mg/mL vai mM),

— koncentrāciju izvēles un kultūru skaita izvēles pamatojums, piem., dati par citotoksicitāti un šķīdības robežām,

— barotnes sastāvs, attiecīgā gadījumā CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,

— barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums),

— inkubācijas temperatūra,

— inkubācijas laiks,

— apstrādes ilgums,

— šūnu ievākšanas laiks pēc apstrādes,

— attiecīgā gadījumā šūnu blīvums uzsēšanas laikā,

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles),

— pozitīvās un negatīvās kontroles ķimikālijas, galīgās koncentrācijas katram no apstrādes apstākļiem,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes un izmantotais šūnu iekrāsošanas paņēmiens,

— testu pieņemamības kritēriji,

— aberāciju novērtēšanas kritēriji,

— analizēto metafāzes šūnu skaits,

— citotoksicitātes mērīšanas metodes,

— jebkāda papildu informācija, kas attiecas uz citotoksicitāti un izmantoto metodi,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

— pH, osmolalitātes un nogulšņu noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— apstrādāto šūnu skaits un ievākto šūnu skaits katrai kultūrai, ja tiek izmantotas šūnu līnijas,

— citotoksicitātes rādītāji, piem., *RPD*, *RICC*, MI, citi novērojumi, ja tādi ir,

— šūnu līnijām — informācija par šūnas cikla garumu, dubultošanās laiks vai proliferācijas indekss,

— nogulšņu pazīmes un noteikšanas laiks,

▼M7

— aberāciju, tostarp pārtraukumu, definīcija,

— novērtēto šūnu skaits, šūnu ar hromosomu aberācijām skaits un hromosomu aberāciju veids, kas norādīts atsevišķi par katru apstrādāto kultūru un kontrolkultūru, ar pārtraukumiem un bez tiem,

— ploiditātes izmaiņas (poliploīdas šūnas un šūnas ar endoreduplicētām hromosomām norāda atsevišķi), ja tādas novērotas,

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

— paralēlo negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātāja) un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes, 95 % sadalījuma kontroles robežas, kā arī datu skaits,

— statistiskā analīze, p-vērtības, ja tādas ir.

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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 and 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-New York- 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*, Vol. 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) Šā pielikuma B.49. nodaļa "Zīdītāju *in vitro* šūnu mikrokodolu tests".

(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*, Vol. 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 Res*earch, 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 UK Environmental Mutagen Society Working Party. 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", in *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,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) *UNEP* (2001), Stokholmas Konvencija par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem, Apvienoto Nāciju Organizācijas Vides programma (*UNEP*). Pieejama tīmekļa vietnē 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", in *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. Pieejams pēc pieprasījuma.

(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. Pieejams tīmekļa vietnē 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*", in *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", in *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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Apoptoze: programmēta šūnu nāve, ko raksturo virkne posmu, kuros šūnas sabrūk membrānās ieslēgtās daļiņās, kas pēc tam tiek iznīcinātas fagocitozē vai izvadītas.

Šūnu savairošanās: šūnu skaita pieaugums šūnu mitotiskās dalīšanās rezultātā.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromatīdas pārrāvums: vienas hromatīdas pārtrūkums, kurā vienas hromatīdas daļas ir acīmredzami nobīdītas viena no otras.

Hromatīdas pārtraukums: vienas hromatīdas rajons, kas neiekrāsojas (ahromatisks bojājums), kurā hromatīdas daļas ir nobīdītas minimāli.

Hromatīdas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošanās.

Hromosomas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošanās vienā un tajā pašā vietā.

Klastogēns: jebkura ķimikālija, kas izraisa strukturālas hromosomas tipa aberācijas šūnu vai eikariotu populācijās.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas barotnē.

Citotoksicitāte: šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto šūnu līnijas, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu populācijas relatīvās dubultošanās rādītāja (*RPD*) vai šūnu skaita relatīvā pieauguma (*RICC*) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 17. punktu un 2. papildinājumu). Šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto limfocītu primārās kultūras, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu mitotiskā indeksa (MI) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 18. punktu un 2. papildinājumu).

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nevis notiek šūnas kodola mitoze, bet sākas jauns S periods. Tā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16... hromatīdām.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un saiknes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskais indekss (MI): metafāzē esošo šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu šūnu populācijā; raksturo šūnu savairošanās pakāpi šajā populācijā.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mutagēns: faktors, kas izraisa pārmantojamas DNS bāzu pāru sekvences vai sekvenču izmaiņas gēnos vai hromosomu struktūrā (hromosomu aberācijas).

▼M7

Hromosomu skaita aberācija: testam izmantojamajām šūnām raksturīgā parastā hromosomu skaita izmaiņas.

Poliploīdija: tāda hromosomu skaita aberācija šūnās vai organismos, kas skar veselu(-s) hromosomu komplektu(-s) (pretstatā aneiploīdijai, kas skar vienu vai vairākas atsevišķas hromosomas).

p53 statuss: p53 proteīns ir iesaistīts šūnas cikla regulēšanā, apoptozē un DNS reparācijā. Šūnām, kurām funkcionāla p53 proteīna nav un kuras tāpēc nespēj, reaģējot uz DNS bojājumiem, apturēt šūnas ciklu vai likvidēt bojātās šūnas ar apoptozi vai citiem paņēmieniem (piem., inducējot DNS reparāciju), kas saistīti ar p53 funkcijām, teorētiski vajadzētu būt uzņēmīgākām pret gēnu mutācijām vai hromosomu aberācijām.

Šūnu skaita relatīvais pieaugums (*RICC*): šūnu skaita palielināšanās ķimikālijai eksponētās kultūrās attiecībā pret to skaita palielināšanos neapstrādātās kultūrās, izteikta procentos.

Populācijas relatīvā dubultošanās (*RPD*): populācijas dubultošanos skaita palielināšanās ķimikālijai eksponētās kultūrās attiecībā pret to skaita palielināšanos neapstrādātās kultūrās, izteikta procentos.

S9 aknu frakcija: aknu homogenāta supernatants pēc 9 000 g centrifugēšanas, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: S9 aknu frakcijas un metabolisko fermentu darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins to kontrolkultūru apzīmēšanai, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Strukturāla aberācija: hromosomas struktūras izmaiņas, kas detektējamas, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija, intrahromosomiskas modifikācijas [*intrachanges*] vai interhromosomiskas modifikācijas [*interchanges*].

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

▼M7

2. papildinājums

FORMULAS CITOTOKSICITĀTES NOVĒRTĒŠANAI

Mitotiskais indekss (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Mitotisku šūnu skaits}}{\text{Kopējais saskaitīto šūnu skaits}} \times 100$$

ieteicams lietot **šūnu skaita relatīvā pieauguma (*RICC*)** vai **populācijas relatīvās dubultošanās (*RPD*)** rādītājus, jo tie abi ņem vērā to šūnu populācijas daļu, kura ir dalījusies.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Šūnu skaita palielinājums apstrādātajās kultūrās(beigu sk. – sākumsk.))}}{(\text{Šūnu skaita palielinājums kontrolkultūrās(beigu sk. – sākumsk.))}} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Populācijas dubultošanās apstrādātās kultūrās : reižu sk.})}{(\text{Populācijas dubultošanās kontrolkultūrās : reižu sk.})} \times 100$$

kur:

Populācijas dubultošanās = [log (šūnu skaits pēc apstrādes ÷ šūnu skaits sākumā)] ÷ log 2

Piemēram, *RICC* vai *RPD* 53 % apmērā norāda uz 47 % citotoksicitāti/citostāzi, un 55 % ar MI izmērītā citotoksicitāte/citostāze nozīmē, ka faktiskais MI ir 45 % kontroles.

Jebkurā gadījumā šūnu skaits pirms apstrādes jāizmēra, un apstrādātajās kultūrās un negatīvās kontroles kultūrās tam jābūt vienādam.

Kaut arī iepriekš par citotoksicitātes parametru ticis izmantots *RCC* (t. i., šūnu skaits apstrādātajās kultūrās/šūnu skaits kontrolkultūrās), to izmantot vairs nav ieteicams, jo tas var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu.

Negatīvās kontroles kultūrās populācijas dubultojumam jābūt savietojamam ar prasību pēc apstrādes šūnu paraugošanu veikt tad, kad apritējuši aptuveni 1,5 normāli šūnas cikli, un mitotiskajam indeksam jābūt pietiekami augstākam, lai iegūtu pietiekamu mitozē esošu šūnu skaitu un droši aprēķinātu 50 % samazinājumu.;

▼M7

B.11. ZĪDĪTĀJU KAULU SMADZEŅU HROMOSOMU ABERĀCIJAS TESTS

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 475 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Zīdītāju kaulu smadzeņu hromosomu aberācijas *in vivo* tests genotoksicitātes novērtēšanā ir īpaši svarīgs, jo, kaut arī tie var atšķirties atkarībā no sugas, *in vivo* metabolisma, farmakokinētikas un DNS reparācijas procesu faktori ir aktīvi un sekmē atbildreakcijas rašanos. *In vivo* testu var izmantot arī tam, lai sīkāk izpētītu *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti.

Zīdītāju hromosomu aberācijas *in vivo* testu izmanto tādu strukturālu hromosomu aberāciju noteikšanai, ko testējamās ķimikālijas izraisa dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzeņu šūnās (2) (3) (4) (5). Ir iespējamas divu veidu strukturālās hromosomu aberācijas — hromosomu vai hromatīdu. Kaut arī lielākā daļa genotoksisko ķimikāliju izraisa hromatīdas tipa aberācijas, tomēr rodas arī hromosomas tipa aberācijas. Hromosomu bojājumi un ar tām saistītie notikumi ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir vērā ņemami pierādījumi, ka gadījumos, kad šie bojājumi un ar tām saistītie notikumi rada onkogēnu un tumorsupresorgēnu izmaiņas, tie cilvēkos un eksperimentu sistēmās ir saistāmi ar vēzi. Hromosomu aberāciju *in vivo* testos var rasties poliploīdija (tostarp endoreduplikācija). Tomēr poliploīdijas palielinājums pats par sevi neliecina par aneigēnu potenciālu un var vienkārši liecināt par šūnas cikla perturbāciju vai citotoksicitāti. Šis tests nav veidots, lai mērītu aneiploīdiju. Aneiploīdijas detektēšanai ieteicamie *in vivo* un *in vitro* testi ir attiecīgi zīdītāju eritrocītu mikrokodolu *in vivo* tests (šā pielikuma B.12. nodaļa) vai zīdītāju šūnu mikrokodolu *in vitro* tests (šā pielikuma B.49. nodaļa).

Izmantoto terminu definīcijas ir izklāstītas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Šajā testā parasti izmanto grauzējus, bet dažos gadījumos ir vietā izmantot citas sugas, ja tas ir zinātniski pamatoti. Šajā testā mērķaudi ir kaulu smadzenes, jo tās ir ļoti labi apasiņotas, turklāt šo audu šūnu cikls ir īss un tās ir viegli izolējamas un apstrādājamas. Ja žurku un peļu vietā izmanto citas sugas, pārskatā jāsniedz to izmantošanas zinātniskais pamatojums. Ja grauzējus neizmanto, ieteicams kaulu smadzeņu hromosomu aberācijas mērījumu integrēt citā piemērotā toksicitātes testā.

Ja ir pierādījumi, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) vai tās metabolīts(-i) mērķaudos nenonāk, šo testu izmantot var nebūt lietderīgi.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

▼M7

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pēc apstrādes pienācīgā laikā humāni eitanazē. Pirms eitanāzijas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piem., kolhicīnu vai kolcemīdu). Tad no kaulu smadzeņu šūnām pagatavo hromosomu preparātus, kurus iekrāso, un metafāzes šūnām nosaka hromosomu aberācijas.

LABORATORIJAS KVALIFIKĀCIJAS VERIFICĒŠANA

Kompetences noskaidrošana

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jādemonstrē spēja reproducēt publicētajos datos paredzētos rezultātus (piem., (6)) attiecībā uz hromosomu aberācijas biežumu ar vismaz divām pozitīvās kontroles ķimikālijām (tostarp vāju atbildreakciju, kas inducēta ar mazām pozitīvo kontroļu devām), piemēram, tām, kuras uzskaitītas 1. tabulā, un ar saderīgām nesēja/šķīdinātāja kontrolēm (sk. 22. punktu). Šajos eksperimentos jāizmanto devas, kas rada reproducējamus un ar devām saistītus pieaugumus un parāda interesējošo audu (kaulu smadzeņu) testēšanas sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, un tajos izmanto to novērtēšanas metodi, kas tiks izmantota laboratorijā. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 10.–14. punktā.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas laikā laboratorijai jānosaka:

— vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums un

— vēsturisko negatīvo kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Vēsturisko kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzei jābūt statistiski robustai, lai nodrošinātu laboratorijas spēju novērtēt tās negatīvo kontroļu datu sadalījumu. Avoti liecina, ka jāveic vismaz 10 eksperimenti, bet vēlami būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta", laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (7)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (8).

Ja laboratorija kompetences noskaidrošanas laikā (sk. 9. punktu) neveic pietiekami daudz eksperimentu, lai izveidotu statistiski robustu negatīvo kontroļu sadalījumu (sk. 11. punktu), ir pieņemami šo sadalījumu izveidot, veicot pirmos regulārās izmantošanas testus. Tādā gadījumā jāievēro literatūrā (8) izklāstītie ieteikumi, un šajos eksperimentos iegūtajiem negatīvo kontroļu rezultātiem jāatbilst publicētajiem negatīvo kontroļu datiem.

▼M7

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to ietekmi uz eksperimentā iegūtajiem datiem; jāsaglabā to atbilstība laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jauna vēsturisko kontroļu datubāze jāveido vienīgi būtisku neatbilstību rezultātā, ja eksperts atzinis, ka sadalījums atšķiras no iepriekšējā sadalījuma (sk. 11. punktu). Veidojot jaunu datubāzi, lai varētu veikt testu, nav nepieciešama pilnīga negatīvo kontroļu datubāze, ja vien laboratorija var pierādīt, ka paralēlo negatīvo kontroļu vērtības atbilst vai nu iepriekšējās datubāzes datiem, vai arī ar attiecīgajiem publicētajiem datiem.

Negatīvo kontroļu datos jāietver informācija par hromosomu strukturālo aberāciju (izņemot pārtraukumus) sastopamību katrā dzīvniekā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 11. punktu), un nav pierādījumu, ka būtu pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto žurkas, bet var izmantot arī peles. Var izmantot arī jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus, ja pārskatā tiek sniegts zinātnisks pamatojums.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22° C (± 3 °C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, grauzēji jātur nelielās (ne vairāk par pieciem uz vienu būri) viena dzimuma un vienādas apstrādes grupās, vēlams, būros ar cietu grīdu un pienācīgu vides bagātinājumu. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

Parasti izmanto veselus, jaunus pieaugušus dzīvniekus (ja tie ir grauzēji, apstrādes sākumā tiem vēlams būt 6–10 nedēļas veciem, taču ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki), kurus pēc nejaušības principa iedala kontroles un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, mikročipējot vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Jāizvairās no pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas savstarpējas kontaminācijas. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 % no vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpiejauc barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosolu. Ja vien

▼M7

dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Šķīdinātājs/nesējs

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesējus uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē strukturālas aberācijas vai citu kaitīgu ietekmi, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Parasti katrā testā jāiekļauj dzīvnieku grupa, kas apstrādāta ar pozitīvās kontroles ķimikāliju. To var nedarīt, ja testējošā laboratorija ir pierādījusi savu kompetenci šā testa veikšanā un ir izveidojusi pozitīvās kontroles vēsturisko diapazonu. Ja paralēlā pozitīvā kontrolgrupa netiek ietverta, katrā eksperimentā jāiekļauj novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi). To var panākt, pētījuma novērtēšanā iekļaujot pienācīgus etalonparaugus, kas iegūti un saglabāti no atsevišķa pozitīvās kontroles eksperimenta, ko periodiski (piem., ik pēc 6–18 mēnešiem) veic testējošā laboratorija, piem., kompetences testēšanas laikā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

Pozitīvās kontroles ķimikālijām pastāvīgi jārada detektējams tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas, kas pārsniedz spontāno līmeni. Pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr vērtētājs nevarētu uzreiz atklāt kodēto paraugu identitāti. Ir pieļaujami pozitīvo kontroli ievadīt citā ceļā nekā testējamo ķimikāliju, izmantojot citu apstrādes grafiku, un paraugošanu veikt tikai vienā brīdī. Turklāt attiecīgā gadījumā var apsvērt tādu pozitīvās kontroles ķimikāliju izmantošanu, kas pieder pie atbilstošās ķimikāliju klases. Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri

Ķimikālija	*CAS* Nr.
Etilmetānsulfonāts	62-50-0
Metilmetānsulfonāts	66-27-3
Etilnitrozourīnviela	759-73-9
Mitomicīns C	50-07-7
Ciklofosfamīds (monohidrāts)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilēnmelamīns	51-18-3

▼M7

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupu paraugo visās paraugošanas reizēs un ar to apietas tāpat kā ar apstrādes grupu, bet to neapstrādā ar testējamo ķimikāliju. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar šķīdinātāju/nesēju, šis šķīdinātājs/nesējs jāsaņem arī kontrolgrupai. Tomēr, ja testējošās laboratorijas vēsturiskie negatīvo kontroļu dati par katru paraugošanas reizi liecina, ka atšķirības starp dzīvniekiem pastāvīgi ir līdzīgas un līdzīgs ir arī to šūnu sastopamības biežums, kurām ir strukturālas aberācijas, var būt pietiekami negatīvo kontroli paraugot tikai vienreiz. Ja negatīvo kontroļu paraugošanu veic tikai vienreiz, to vajadzētu darīt pirmajā paraugošanas reizē.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Parasti mikrokodolu atbildreakcija tēviņiem un mātītēm ir līdzīga (9), un tas pats ir paredzams hromosomu strukturālo aberāciju gadījumā, tāpēc lielāko daļu pētījumu iespējams veikt ar tiklab viena kā otra dzimuma dzīvniekiem. Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību, toksicitāti kaulu smadzenēm u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piemēram, atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Ja izmanto abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt datus, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu, jāizveido pietiekami lielas grupas, lai vienā grupā būtu vismaz pieci analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abu dzimumu dzīvnieki, vismaz pieci analizējami katra dzimuma dzīvnieki. Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķimikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Maksimālo tipisko dzīvnieku skaita prasību piemērs: kaulu smadzeņu pētījumā ar divām paraugošanas reizēm ar trīs devu grupām un paralēlu negatīvo kontrolgrupu, kā arī pozitīvo kontrolgrupu (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 45 dzīvnieki.

Devu lielums

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā testā (10). Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošas toksicitātes pazīmju izraisīšanas (piem., inducē ķermeņa svara samazināšanos vai hematopoētiskās sistēmas citotoksicitāti), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic humāna eitanāzija (11).

Lielāko devu var definēt arī kā tādu devu, pie kuras novērojamas dažas pazīmes, kas liecina par toksicitāti kaulu smadzenēs.

Ķimikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc ilgtermiņa apstrādes var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīvā kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamā ķimikālija diapazona noteikšanas pētījumā toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg/kg ķermeņa svara. Ja testējamā ķimikālija toksicitāti tomēr izraisa, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu,

▼M7

gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (kaulu smadzenēm), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķimikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Robežtests

Ja devu diapazona noteikšanas eksperimenti vai dati no saistītiem dzīvnieku celmiem liecina, ka apstrādes režīms vismaz ar robeždevu (sk. tālāk) nekādu novērojamu toksisku ietekmi (ne pazeminātu kaulu smadzeņu šūnradi, ne citas pazīmes, kas liecinātu par citotoksisku ietekmi uz mērķaudiem) nerada, un ja, pamatojoties uz genotoksicitātes *in vitro* pētījumiem vai datiem par strukturāli radniecīgām ķimikālijām, genotoksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka veikt pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem nav nepieciešams, ja vien ir pierādīts, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) mērķaudus (kaulu smadzenes) sasniedz. Tādos gadījumos var pietikt ar vienu devas līmeni — robeždevu. Attiecībā uz > 14 dienu ievadīšanas periodu robeždeva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz 14 dienu vai īsāku ievadīšanas periodu robeždeva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Devu ievadīšana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, vietēju aplicēšanu, zemādas ievadīšanu, intravenozu ievadīšanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzeramajam ūdenim, jo īpaši ar vienreizēju devu, jārūpējas, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 33.–34. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Parasti tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumu gadījumu, kad var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Ja izmanto lielāku tilpumu, tas jāpamato. Izņemot gadījumus, kad tiek izmantotas kairinošas vai korozīvas testējamās ķimikālijas, kuru ietekme lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir līdz minimumam jāsamazina tilpuma variabilitāte, koriģējot koncentrāciju tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

Apstrādes kārtība

Parasti testējamās ķimikālijas ievada vienā apstrādes reizē, taču tās var ievadīt arī dalīti (t. i., divās vai vairākās reizēs vienā un tajā pašā dienā ar ne vairāk kā 2–3 stundu starplaiku), kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Tādā gadījumā vai ievadot testējamo ķimikāliju ar inhalāciju, paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas laiku vai ekspozīcijas beigām.

Par atkārtotas devas protokola piemērotību šim testam ir pieejams maz datu. Tomēr gadījumos, kad ir vēlams šo testu integrēt ar atkārtotas devas toksicitātes testu, jārūpējas par to, lai novērstu hromosomāli bojātu mitotisko šūnu zudumu, kas var rasties pie toksiskām devām. Tāda integrēšana ir pieņemama, ja lielākā

▼M7

deva pārsniedz robeždevu vai ir vienāda ar to (sk. 29. punktu) un devas grupai apstrādes perioda laiku dod robeždevu. Kad vajadzīga integrēšana ar citiem pētījumiem, par vēlamo *in vivo* testu hromosomu aberāciju noteikšanai uzskatāms mikrokodolu tests (testēšanas metode B.12.)

Pēc vienreizējas apstrādes kaulu smadzeņu paraugi jāņem divos dažādos laikos. Attiecībā uz grauzējiem pirmajam paraugošanas intervālam vajadzētu būt laikam, kas nepieciešams 1,5 normālu šūnas ciklu apritēšanai (parasti 12–18 stundas pēc apstrādes). Tā kā testējamās(-o) ķimikālijas(-u) uzņemšanai un metabolizēšanai, kā arī tās iedarbībai uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgs laiks, kas var ietekmēt hromosomu aberāciju noteikšanas optimālo laiku, otro paraugošanu ieteicams veikt 24 stundas pēc pirmās paraugošanas. Pirmajā paraugošanas reizē jāapstrādā visas devu grupas un jāsavāc paraugi analīzei, taču nākamajā(-s) paraugošanas reizē(-s) jāievada tikai lielākā deva. Ja ar zinātnisku pamatojumu tiek izmantoti devu režīmi, kuri aptver vairāk nekā vienu dienu, parasti jāizmanto viens paraugošanas laiks — aptuveni 1,5 normālo šūnu ciklus pēc galīgās apstrādes.

Pēc apstrādes un pirms paraugošanas dzīvniekiem intraperitoneāli injicē atbilstošu devu metafāzi apturoša faktora (piem., kolcemīda vai kolhicīna) un pēc atbilstoša intervāla veic paraugošanu. Pelēm šis intervāls ir aptuveni 3–5 stundas pirms paraugošanas, bet žurkām — 2–5 stundas. Savāc kaulu smadzeņu šūnas, tās piebriedina, fiksē un iekrāso un analizē uz hromosomu aberācijām (12).

Novērojumi

Katru dienu vismaz reizi dienā, vēlams — vienā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc aplicēšanas, jāizdara vispārēji testa dzīvnieku klīniskie novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra pārtikas patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārliekas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām humāni eitanazē (11).

Mērķaudu ekspozīcija

Asins paraugi jāņem pienācīgā(-os) laikā(-os), lai būtu iespējams noskaidrot testējamās ķimikālijas līmeni plazmā un gadījumos, kad tas vajadzīgs un citu datu par ekspozīciju nav, varētu pierādīt, ka kaulu smadzeņu ekspozīcija ir notikusi (sk. 44. punktu).

Kaulu smadzeņu un hromosomu sagatavošana

Uzreiz pēc humānas eitanāzijas no augšstilba kaula vai lielā lielakaula iegūst kaulu smadzeņu šūnas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē. Tad metafāzes šūnas uznes uz priekšmetstikliņiem un iekrāso, izmantojot vispārpieņemtas metodes (sk. (3) (12)).

▼M7

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, pirms analīzes neatkarīgi jākodē un jārandomizē, lai vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti.

Lai noteiktu citotoksicitāti, jānosaka mitotiskais indekss vismaz 1 000 šūnām no katra apstrādātā dzīvnieka (tostarp pozitīvajām kontrolēm), kā arī no katra neapstrādātā vai nesēja/šķīdinātāja negatīvās kontroles dzīvnieka.

Vismaz 200 katra dzīvnieka metafāzes analizē uz strukturālajām hromosomu aberācijām (ar pārtraukumiem un bez tiem) (6). Tomēr, ja vēsturisko negatīvo kontroļu datubāze liecina, ka vidējais strukturālu hromosomu aberāciju fona biežums testējošajā laboratorijā ir < 1 %, jāapsver papildu šūnu novērtēšana. Hromatīdas un hromosomas tipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē apakštipos (pārrāvumi un apmaiņas). Laboratorijā izmantotajām procedūrām jānodrošina, ka hromosomu aberāciju analīzi veic apmācīti vērtētāji un ka attiecīgā gadījumā to profesionālizvērtē. Apzinoties, ka priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā bieži tiek bojāta daļa metafāzes šūnu, kuras zaudē hromosomas, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vienādam ar vismaz $2n \pm 2$, kur n ir konkrētās sugas haploidālais hromosomu skaits.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulā. Izvērtē katra dzīvnieka šūnu mitotisko indeksu, novērtēto metafāzes šūnu skaitu, aberāciju skaitu uz vienu metafāzes šūnu un to šūnu procentuālo daļu, kurām novērojama(-s) strukturāla(-s) hromosomu aberācija(-s). Uzskaita dažādu veidu strukturālās hromosomu aberācijas, norādot to skaitu un biežumu gan apstrādātajās grupās, gan kontrolgrupās. Atsevišķi reģistrē pārtraukumus, kā arī poliploīdas šūnas un šūnas ar endoreduplicētām hromosomām. Ziņo par pārtraukumu biežumu, bet strukturālo aberāciju kopējā biežuma analīzē to parasti neiekļauj. Ja nekas neliecina par atšķirīgu atbildreakciju atkarībā no dzīvnieku dzimuma, statistiskās analīzes veikšanai datus var apvienot. Jāziņo arī dati par dzīvniekiem novēroto toksicitāti un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

a) paralēlās negatīvās kontroles datiem tiek uzskatīti par pieņemamiem iekļaušanai laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzē (sk. 11.–14. punktu);

b) paralēlās pozitīvās kontroles vai novērtēšanas kontroles inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 20.–21. punktu);

c) ir analizēts pienācīgs devu un šūnu skaits;

d) lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 25.–28. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par vienozīmīgi pozitīvu, ja:

▼M7

a) vismaz vienai no apstrādes grupām novērojams statistiski nozīmīgs tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas (izņemot pārtraukumus), salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

b) šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz vienā paraugošanas reizē ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu un

c) kāds no šiem rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

Ja konkrētajā paraugošanas reizē tiek izvērtēta tikai lielākā deva, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja novērojams statistiski nozīmīgs pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli un rezultāti atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma). Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūras sarakstā (13). Veicot devas–atbildreakcijas analīzi, jāanalizē vismaz trīs apstrādātas devu grupas. Statistikas testos eksperimenta vienība ir dzīvnieks. Pozitīvi hromosomālo aberāciju testa rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija testa sugas dzīvnieku kaulu smadzenēs inducē strukturālas hromosomu aberācijas.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos:

a) nevienai no apstrādes grupām nav novērojams statistiski nozīmīgs tādu šūnu biežuma pieaugums, kurām ir strukturālas hromosomu aberācijas (izņemot pārtraukumus), salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

b) to izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, nevienā paraugošanas reizē nav novērojams ar devu saistīts palielinājums;

c) visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma); un

d) kaulu smadzenes ir bijušas eksponētas testējamai(-ām) ķimikālijai(-ām).

Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (13). Par kaulu smadzeņu eksponētību testējamajai ķimikālijai var liecināt, piemēram, mitotiskā indeksa samazināšanās vai testējamās(-o) ķimikālijas(-u) līmeņa mērījums plazmā vai asinīs. Intravenozas ievadīšanas gadījumā pierādījumi par eksponētību nav nepieciešami. Alternatīvi kaulu smadzeņu eksponētības pierādīšanai var izmantot *ADME* datus, kas iegūti neatkarīgā pētījumā, kurā izmantots tas pats ceļš un tā pati suga. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testējamā ķimikālija neinducē strukturālas hromosomu aberācijas testa sugas dzīvnieku kaulu smadzenēs.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai viennozīmīgi negatīvu atbildreakciju verificēt.

Gadījumos, kad atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai pozitīva, lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu (piem., vājš vai neskaidrs pieaugums), dati jānovērtē ekspertam un/vai jāpabeidz esošo eksperimentu sīkāka izskatīšana. Dažos gadījumos varētu būt lietderīgi analizēt lielāku skaitu šūnu vai veikt atkārtotu eksperimentu, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus.

▼M7

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas dati neļauj secināt, ka testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka pētījuma rezultāts ir neskaidrs.

Poliploīdu un endoreduplicētu metafāzes šūnu biežums attiecībā pret metafāzes šūnām kopā jāreģistrē atsevišķi. Poliploīdo/endoreduplicēto šūnu skaita pieaugums var norādīt uz to, ka testējamai ķimikālijai, iespējams, piemīt potenciāls inhibēt mitotiskos procesus vai šūnu cikla progresu (sk. 3. punktu).

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma.

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,

— barības, dzeramā ūdens vai inhalāciju preparātu sagatavošana,

— analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tie izdarīti.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.,

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode,

— īstermiņa pētījumiem: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās; pētījumiem, kas notiek ilgāk par nedēļu: katra dzīvnieka svars pētījuma laikā un pārtikas patēriņš. Iekļauj katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

▼M7

Testēšanas apstākļi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles,

— diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts,

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas ievadīšanu,

— izvēlētā ievadīšanas ceļa un ilguma pamatojums,

— metodes, kā verificēts, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) nonākusi(-šas) vispārējā asinsritē vai kaulu smadzenēs,

— faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— eitanāzijas paņēmiens,

— atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota),

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— metafāzes apturēšanai izmantotās ķimikālijas identitāte, tās koncentrācija, deva un laiks no ievadīšanas līdz paraugošanai,

— paraugu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,

— aberāciju novērtēšanas kritēriji,

— analizēto katra dzīvnieka metafāzes šūnu skaits un mitotiskā indeksa noteikšanai analizēto šūnu skaits,

— pētījuma pieņemamības kritēriji,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

Rezultāti:

— dzīvnieka stāvoklis pirms testēšanas perioda un tā laikā, arī toksicitātes pazīmes,

— mitotiskais indekss, ko norāda par katru dzīvnieku atsevišķi,

— aberāciju un aberanto šūnu tips un skaits, ko norāda par katru dzīvnieku atsevišķi,

— kopējais aberāciju skaits grupās, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— šūnu ar aberācijām skaits katrā grupā, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— ploīdijas izmaiņas, ja tās tiek novērotas, tostarp poliploīdo un/vai endoreduplicēto šūnu biežums,

▼M7

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība,

— izmantotā statistiskā analīze un metode,

— kaulu smadzeņu eksponētību apliecinoši dati,

— paralēlo negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības, standartnovirzes un 95 % kontroles robežas sadalījumam, kā arī aptvertais laikposms un novērojumu skaits,

— izpildītie pozitīvas vai negatīvas atbildreakcijas kritēriji.

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Atsauces.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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", in 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. *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.

(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", 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.

▼**M7**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: jebkāda novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu(-iem) (sal. "poliploīdija").

Centromērs: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromatīdas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošanās.

Hromosomas tipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošanās vienā un tajā pašā vietā.

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nevis notiek šūnas kodola mitoze, bet sākas jauns S periods. Rezultātā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16... hromatīdām.

Pārtraukums: ahromatisks bojājums, kurš ir mazāks par vienas hromatīdas platumu un kurā hromatīdas daļas ir nobīdītas minimāli.

Mitotiskais indekss: attiecība starp mitozes šūnu skaitu un šūnu kopējo skaitu populācijā, kas ir vairošanās statusa mērs attiecīgajā šūnu populācijā.

Hromosomu skaita aberācija: testam izmantoto dzīvnieku parastā hromosomu skaita izmaiņas (aneiploīdija).

Poliploīdija: tāda hromosomu skaita aberācija, kas skar veselu hromosomu komplektu, pretstatā hromosomu skaita izmaiņām hromosomu komplekta daļā (sal. "aneiploīdija").

Strukturāla hromosomas aberācija: hromosomas struktūras izmaiņas, kas detektējamas, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija, intrahromosomiskas vai interhromosomiskas modifikācijas.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M7

2. papildinājums

FAKTORIĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI *IN VIVO* HROMOSOMĀLO ABERĀCIJU TESTĀ

Faktoriālais plāns un tā analīze

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkotie efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., *SPSS*, *SAS*, *STATA*, *Genstat*, kā arī izmantojot *R*.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsauces) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgrīkos.

Analīzi turpina, *ANOVA* tabulā ([1]) apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz *ANOVA* grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastus visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi ļauj pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos [*pair-wise test*] testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto eksperimentu plānošanas metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmeļošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

([1]) Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models* (*GLM*), var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto *ANOVA* tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

▼**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 & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. ZĪDĪTĀJU ERITROCĪTU MIKROKODOLU TESTS

Ievads

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 474 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Zīdītāju mikrokodolu *in vivo* tests genotoksicitātes novērtēšanā ir īpaši svarīgs, jo, kaut arī tie var atšķirties atkarībā no sugas, *in vivo* metabolisma, farmakokinētikas un DNS reparācijas procesu faktori ir aktīvi un sekmē atbildreakcijas rašanos. *In vivo* testu var izmantot arī tam, lai sīkāk izpētītu *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti.

Zīdītāju mikrokodolu *in vivo* testu izmanto, lai detektētu bojājumus, ko testējamā ķimikālija inducējusi hromosomās vai eritroblastu mitotiskajā aparātā. Ar šo testu izvērtē mikrokodolu veidošanos eritrocītos, kas paraugoti dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzenēs vai perifērisko asiņu šūnās.

Ar mikrokodolu testu nosaka, kādas ķimikālijas izraisa citoģenētiskus bojājumus, kuru dēļ veidojas mikrokodoli, kuros ir vai nu aizkavējušos hromosomu fragmenti, vai veselas hromosomas.

Kad kaulu smadzeņu eritroblasts attīstās par nenobriedušu eritrocītu (dažreiz to sauc arī par polihromatocītu vai retikulocītu), galvenais kodols tiek izspiests; izveidojušies mikrokodoli var palikt citoplazmā. Šajās šūnās ieraudzīt vai detektēt mikrokodolus ir vieglāk, jo tām nav galvenā kodola. Tas, ka apstrādātajos dzīvniekos pieaug tādu nenobriedušu eritrocītu skaits, kuriem ir mikrokodoli, liecina par izraisītām strukturālām vai skaitliskām hromosomālām aberācijām.

Jaunizveidojušos eritrocītus ar mikrokodoliem identificē un kvantificē ar iekrāsošanu, kam seko vai nu vizuāla novērtēšana, izmantojot mikroskopu, vai automātiska analīze. Pietiekami daudzu nenobriedušu eritrocītu saskaitīšanu pieaugušu dzīvnieku perifēriskajās asinīs vai kaulu smadzenēs būtiski atvieglo automātiskas novērtēšanas platforma. Tādas platformas ir pieņemamas alternatīvas manuālai izvērtēšanai (2). Salīdzinošie pētījumi ir pierādījuši, ka tādas metodes, izmantojot pienācīgus kalibrēšanas standartus, var uzlabot reproducējamību citās laboratorijās un tajā pašā laboratorijā un dot labāku jutību nekā manuāla novērtēšana ar mikroskopu (3) (4). Automātiskas sistēmas, kas var izmērīt mikrokodolu eritrocītu biežumu, ir plūsmas citometri (5), attēlu analizēšanas platformas (6) (7) un lāzerskenēšanas citometri (8), bet ne tikai.

Kaut arī parasti testā to nedara, hromosomu fragmentus pēc vairākiem kritērijiem var atšķirt no veselām hromosomām. Pie tiem pieder kinetohora vai centromēriskas DNS klātbūtne vai trūkums, kas abi ir raksturīgi neskartām hromosomām. Kinetohora vai centromēriskas DNS trūkums norāda, ka mikrokodols satur vienīgi hromosomu fragmentus, savukārt to klātesamība norāda uz hromosomu zudumu.

Izmantoto terminu definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

▼M7

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Šajā testā par mērķaudiem ģenētisko bojājumu noteikšanai parasti izmanto jaunu pieaugušu grauzēju kaulu smadzenes, jo šajos audos veidojas eritrocīti. Citām zīdītāju sugām, kurām ir konstatēta pietiekama jutība pret ķimikālijām, kas šajās šūnās rada strukturālas hromosomu aberācijas vai hromosomu skaita aberācijas (nenobriedušos eritrocītos inducējot mikrokodolus), ja ir sniegts zinātnisks pamatojums, nenobriedušu eritrocītu mikrokodolus var mērīt perifēriskajās asinīs. Galvenais beigupunkts ir mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu biežums. Ja sugai nav raksturīga izteikta mikrokodolus saturošu šūnu atdalīšana liesā un dzīvnieku pastāvīgas apstrādes periods pārsniedz attiecīgās sugas eritrocītu dzīves cikla garumu (piem., peļu gadījumā — vismaz 4 nedēļas), par beigupunktu var izmantot arī mikrokodolus saturošu nobriedušu eritrocītu biežumu perifēriskajās asinīs.

Ja ir pierādījumi, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) vai tās/to metabolīts(-i) mērķaudos nenonāk, šo testu izmantot var nebūt piemēroti.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ceļā eksponē testējamajai ķimikālijai. Ja izmanto kaulu smadzenes, dzīvniekus piemērotā(-os) laikā(-os) pēc apstrādes humāni eitanazē, no tiem ekstrahē kaulu smadzenes un sagatavo un iekrāso preparātus (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Ja izmanto perifēriskās asinis, pēc apstrādes noteiktā(-os) laikā(-os) ņem asinis un sagatavo un iekrāso preparātus (12) (16) (17) (18). Veicot akūtu apstrādi, ir svarīgi izvēlēties tādus kaulu smadzeņu vai asiņu ņemšanas laikus, kuros iespējams detektēt ar apstrādi saistītu mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu inducēšanos. Ja paraugo perifēriskās asinis, jābūt pagājušam pietiekami ilgam periodam, lai šīs pārmaiņas būtu novērojamas asinsritē. Preparātos mikrokodolu klātbūtni nosaka, veicot apskati ar mikroskopu, attēlu analīzi, plūsmas citometriju vai lāzerskenēšanas citometriju.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

Kompetences noskaidrošana

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jādemonstrē spēja reproducēt publicētajos datos paredzētos rezultātus (17) (19) (20) (21) (22) attiecībā uz mikrokodolu biežumu ar vismaz divām pozitīvās kontroles ķimikālijām (tostarp vāju atbildreakciju, kas inducēta ar mazām pozitīvo kontroļu devām), piem., tām, kuras uzskaitītas 1. tabulā, un ar saderīgām nesēja/šķīdinātāja kontrolēm (sk. 26. punktu). Šajos eksperimentos jāizmanto devas, kas rada reproducējamus un ar devām saistītus pieaugumus un parāda interesējošo audu (kaulu smadzeņu vai perifērisko asiņu) testēšanas sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, un tajos izmanto to novērtēšanas metodi, kas tiks izmantota laboratorijā. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 14.–18. punktā.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas laikā laboratorijai jānosaka:

— vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums un

▼M7

— vēsturisko negatīvo kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm, ja tādi ir. Vēsturisko kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzei jābūt statistiski robustai, lai nodrošinātu laboratorijas spēju novērtēt tās negatīvo kontroļu datu sadalījumu. Avoti liecina, ka jāveic vismaz 10 eksperimenti, bet vēlami būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta", laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (23)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (24).

Ja laboratorija kompetences noskaidrošanas laikā (sk. 13. punktu) neveic pietiekami daudz eksperimentu, lai izveidotu statistiski robustu negatīvo kontroļu sadalījumu (sk. 15. punktu), ir pieņemami šo sadalījumu izveidot, veicot pirmos regulārās izmantošanas testus. Tādā gadījumā jāievēro literatūrā (24) izklāstītie ieteikumi, un šajos eksperimentos iegūtajiem negatīvo kontroļu rezultātiem jāatbilst publicētajiem negatīvo kontroļu datiem.

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to ietekmi uz eksperimentā iegūtajiem datiem; jāsaglabā to atbilstība laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jauna vēsturisko kontroļu datubāze jāveido vienīgi būtisku neatbilstību rezultātā, ja eksperts atzinis, ka sadalījums atšķiras no iepriekšējā sadalījuma (sk. 15. punktu). Veidojot jaunu datubāzi, lai varētu veikt testu, nav nepieciešama pilnīga negatīvo kontroļu datubāze, ja vien laboratorija var pierādīt, ka paralēlo negatīvo kontroļu vērtības atbilst vai nu iepriekšējās datubāzes datiem, vai arī ar attiecīgajiem publicētajiem datiem.

Negatīvo kontroļu datos jāietver informācija par mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu sastopamību katrā dzīvniekā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (skatīt 15. punktu), un nav pierādījumu, ka būtu pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Var izmantot peles, žurkas vai citas piemērotas sugas zīdītājus. Ja tiek izmantotas perifēriskās asinis, jānosaka, vai inducēto mikrokodolu detektēšanu izraudzītajā sugā netraucē mikrokodolus saturošo šūnu atdalīšana no asinīm liesā. Tas skaidri

▼M7

pierādīts attiecībā uz peļu un žurku perifēriskajām asinīm (2). Ja žurku un peļu vietā izmanto citas sugas, pārskatā jāsniedz to izmantošanas zinātniskais pamatojums. Ja grauzējus neizmanto, ieteicams inducētā mikrokodola mērījumu integrēt citā piemērotā toksicitātes testā.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Grauzēju gadījumā telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, grauzēji jātur nelielās (ne vairāk par pieciem uz vienu būri) viena dzimuma un vienādas apstrādes grupās, vēlams, būros ar cietu grīdu un pienācīgu vides bagātinājumu. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

Parasti izmanto veselus, jaunus pieaugušus dzīvniekus (vēlams, 6–10 nedēļas vecus grauzējus apstrādes sākumā, taču ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki), kurus pēc nejaušības principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Jāizvairās no pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas savstarpējas kontaminācijas. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 % no vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosolu. Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātājs/nesējs

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesējus uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē mikrokodolus vai citu kaitīgu ietekmi, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

▼M7

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Parasti katrā testā jāiekļauj dzīvnieku grupa, kas apstrādāta ar pozitīvās kontroles ķimikāliju. To var nedarīt, ja testa laboratorija ir pierādījusi savu kompetenci šā testa veikšanā un ir izveidojusi vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazonu. Ja paralēla pozitīvā kontrolgrupa netiek ietverta, katrā eksperimentā jāiekļauj novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi vai šūnu suspensiju paraugi — atkarībā no novērtēšanas metodes). To var panākt, pētījuma novērtēšanā iekļaujot pienācīgus etalonparaugus, kas iegūti un saglabāti no atsevišķa pozitīvās kontroles eksperimenta, ko veic periodiski (piem., ik pēc 6–18 mēnešiem), piem., kompetences testēšanas laikā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

Pozitīvās kontroles ķimikālijām konsekventi jārada detektējams mikrokodolu biežuma pieaugums, kas pārsniedz spontāno līmeni. Veicot manuālu novērtēšanu ar mikroskopu, pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr nolasītājs nevarētu uzreiz atklāt kodēto paraugu identitāti. Ir pieļaujami pozitīvo kontroli ievadīt citā ceļā nekā testējamo ķimikāliju, izmantojot citu apstrādes grafiku, un paraugošanu veikt tikai vienā brīdī. Turklāt attiecīgā gadījumā var apsvērt tādu pozitīvās kontroles ķimikāliju izmantošanu, kas pieder pie atbilstošām ķimikāliju grupām. Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles ķimikāliju piemēri

Ķimikālijas un *CAS* Nr.
Etilmetānsulfonāts [*CAS* Nr. 62-50-0]
Metilmetānsulfonāts [*CAS* Nr. 66-27-3]
Etilnitrozourīnviela [*CAS* Nr. 759-73-9]
Mitomicīns C [*CAS* Nr. 50-07-7]
Ciklofosfamīds (monohidrāts) [*CAS* Nr. 50-18-0 (*CAS* Nr. 6055-19-2)]
Trietilēnmelamīns [*CAS* Nr. 51-18-3]
Kolhicīns [*CAS* Nr. 64-86-8] vai vinblastīns [*CAS* Nr. 865-21-4] — kā aneigēni

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupu iekļauj visos paraugošanas laikos un ar to apietas tāpat kā ar apstrādes grupu, bet to neapstrādā ar testējamo ķimikāliju. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar šķīdinātāju/nesēju, šis šķīdinātājs/nesējs jāsaņem arī kontrolgrupai. Tomēr, ja testējošās laboratorijas vēsturiskie negatīvo kontroļu dati par katru paraugošanas laiku liecina, ka atšķirības starp dzīvniekiem pastāvīgi ir līdzīgas un līdzīgs ir arī to šūnu sastopamības biežums, kurām ir mikrokodoli, var būt pietiekami negatīvo kontroli paraugot tikai vienreiz. Ja negatīvo kontroļu paraugošanu veic tikai vienreiz, to vajadzētu darīt pirmajā paraugošanas reizē.

▼M7

Ja izmanto perifēriskās asinis, tad gadījumos, kad iegūtie dati saskan ar testējošās laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzi, paralēlas negatīvās kontroles vietā īstermiņa pētījumos ir pieņemami izmantot pirmsapstrādes paraugu. Ir pierādīts, ka žurkām pirmsapstrādes paraugošana mazos tilpumos (piem., nepārsniedzot 100 µl dienā) mikrokodolu fona biežumu ietekmē minimāli (25).

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Parasti mikrokodolu atbildreakcija tēviņiem un mātītēm ir līdzīga, tāpēc lielāko daļu pētījumu iespējams veikt ar tiklab viena kā otra dzimuma dzīvniekiem (26). Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību, toksicitāti kaulu smadzenēm u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piemēram, atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Izmantojot abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par datu analizēšanu, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu, jāizveido pietiekami lielas grupas, lai vienā grupā būtu vismaz pieci analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abu dzimumu dzīvnieki, vismaz pieci analizējami katra dzimuma dzīvnieki. Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķimikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Ar piemēru ilustrējot maksimālā tipiskā dzīvnieku skaita prasības — atbilstīgi 37. punktā paredzētajiem parametriem kaulu smadzeņu pētījumā ar trim devu grupām un paralēlām negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 25–35 dzīvnieki.

Devu lielums

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā testā (27). Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošas toksicitātes pazīmju izraisīšanas (piem., inducē ķermeņa svara samazināšanos vai hematopoētiskās sistēmas citotoksicitāti, bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic humāna eitanāzija (28)).

Lielāko devu var definēt arī kā tādu devu, kas rada toksicitāti kaulu smadzenēs (piem., nenobriedušu eritrocītu īpatsvara samazināšanās attiecībā pret to kopējo skaitu kaulu smadzenēs vai perifēriskajās asinīs par vairāk nekā 50 %, bet ne mazāk kā līdz 20 % no kontroles vērtības). Tomēr, analizējot CD71-pozitīvas šūnas perifēriskajā asinsritē (t. i., ar plūsmas citometriju), šī pavisam jaunā nenobriedušu eritrocītu frakcija uz toksiskiem faktoriem reaģē ātrāk nekā lielāka nenobriedušu RNS-pozitīvu eritrocītu kohorta. Tāpēc akūtas ekspozīcijas testos, kuros analizē CD71-pozitīvo nenobriedušo eritrocītu frakciju, var būt novērojama lielāka šķietamā toksicitāte nekā testos, kuros nenobriedušus eritrocītus identificē pēc RNS satura. Šā iemesla dēļ, ja apstrādi eksperimentā veic piecas dienas vai mazāk, toksicitāti izraisošo testējamo ķimikāliju lielāko devu var definēt kā devu, kas statistiski nozīmīgā apmērā samazina CD71-pozitīvo nenobriedušo eritrocītu īpatsvaru attiecībā pret kopējo eritrocītu skaitu, tam nekļūstot mazākam par 5 % no kontroles vērtības (29).

▼M7

Ķimikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc ilgtermiņa ievadīšanas var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīvā kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamā ķimikālija diapazona noteikšanas pētījumā toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai devai 14 dienu vai garākā ievadīšanas periodā jābūt 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, bet ievadīšanas periodos līdz 14 dienām — 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Ja testējamā ķimikālija toksicitāti tomēr izraisa, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu, gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (kaulu smadzenēm), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķimikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Robežtests

Ja devu diapazona noteikšanas eksperimenti vai dati no saistītiem dzīvnieku celmiem liecina, ka apstrādes režīms vismaz ar robeždevu (sk. tālāk) nekādu novērojamu toksisku ietekmi (ne pazeminātu kaulu smadzeņu šūnradi, ne citas pazīmes, kas liecinātu par citotoksisku ietekmi uz mērķaudiem) nerada, un ja, pamatojoties uz genotoksicitātes *in vitro* pētījumiem vai datiem par strukturāli radniecīgām ķimikālijām, genotoksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka veikt pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem nav nepieciešams, ja vien ir pierādīts, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) mērķaudus (kaulu smadzenes) sasniedz. Tādos gadījumos var pietikt ar vienu devas līmeni — robeždevu. Attiecībā uz 14 dienu vai garāku ievadīšanas periodu robeždeva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz ievadīšanas periodu līdz 14 dienām robeždeva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā.

Devu ievadīšana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzeramajam ūdenim, jo īpaši ar vienreizēju devu, jārūpējas, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 37. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Parasti tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumu gadījumu, kad var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Ja izmanto lielāku tilpumu, tas jāpamato. Izņemot gadījumus, kad tiek izmantotas kairinošas vai korozīvas testējamās ķimikālijas, kuru ietekme lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir līdz minimumam jāsamazina tilpuma variabilitāte, koriģējot koncentrāciju tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

▼M7

Apstrādes kārtība

Vēlams veikt 2 vai vairākas apstrādes, ievadīšanu veicot ik pēc 24 stundām, jo īpaši tad, ja šis tests tiek integrēts citos toksicitātes pētījumos. Alternatīvā gadījumā apstrādes var veikt vienu reizi, ja tas ir zinātniski pamatoti (piem., ir zināms, ka testējamās ķimikālijas bloķē šūnas ciklu). Testējamās ķimikālijas devu var dot arī dalīti, t. i., divreiz vai biežāk vienā un tajā pašā dienā ne vairāk kā ik pēc 2–3 stundām, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Tādā gadījumā vai tad, ja testējamo ķimikāliju ievada ar inhalāciju, paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas laiku vai ekspozīcijas beigām.

Testu var veikt ar pelēm vai žurkām vienā no tālāk norādītajiem trim veidiem.

a. Dzīvniekus ar testējamo ķimikāliju apstrādā vienreiz. Kaulu smadzeņu paraugus ņem vismaz divas reizes (no neatkarīgām dzīvnieku grupām) ne ātrāk kā 24 stundas pēc apstrādes un ne vēlāk kā 48 stundas pēc apstrādes ar pienācīgu(-iem) intervālu(-iem) starp paraugošanas reizēm, ja vien nav zināms, ka testējamajai ķimikālijai ir ļoti garš pussabrukšanas periods. Paraugu ņemšana ātrāk nekā 24 stundas pēc apstrādes ir jāpamato. Perifērisko asiņu paraugus (no vienas un tās pašas dzīvnieku grupas) ņem vismaz divreiz: pirmo reizi ne ātrāk kā 36 stundas pēc apstrādes, ar piemērotu(-iem) intervālu(-iem) pēc pirmās paraugošanas, bet ne vēlāk kā 72 stundas pēc apstrādes. Pirmajā paraugošanas reizē jāapstrādā visas devu grupas un jāsavāc paraugi analīzei, taču nākamajā(-s) paraugošanas reizē(-s) jāievada tikai lielākā deva. Ja vienā paraugošanas reizē tiek detektēta pozitīva atbildreakcija, papildu paraugošana nav jāveic, ja vien nav nepieciešams iegūt kvantitatīvu informāciju par atbildreakciju uz devu. Aprakstītie ievākšanas laiki izriet no mikrokodolu parādīšanās un pazušanas kinētikas šo divu veidu audos.

b. Gadījumos, kad veic divas apstrādes dienā (piem., divas apstrādes ar 24 stundu intervālu), paraugus ņem vienu reizi 18 līdz 24 stundu laikā pēc galīgās apstrādes gadījumos, kad ņem kaulu smadzeņu paraugus, vai 36 līdz 48 stundu laikā pēc galīgās apstrādes gadījumos, kad ņem perifērisko asiņu paraugus (30). Aprakstītie ievākšanas laiki izriet no mikrokodolu parādīšanās un pazušanas kinētikas šo divu veidu audos.

c. Ja apstrāde notiek trīs vai vairāk reizes dienā (piem., trīs vai vairāk apstrādes ar apmēram 24 stundu intervāliem), kaulu smadzeņu paraugošana jāveic ne vēlāk kā 24 stundas pēc pēdējās apstrādes, bet perifēriskās asinis jāsavāc ne vēlāk kā 40 stundas pēc pēdējās apstrādes (31). Šajā apstrādes variantā var apvienot "komētas" testu (piem., paraugojot 2–6 stundas pēc pēdējās apstrādes) un mikrokodolu testu un mikrokodolu testu integrēt atkārtotas devas toksicitātes pētījumos. Apkopotie dati liecina, ka mikrokodolu inducēšanos šādos garākos laikposmos iespējams novērot, ja ievadīšana ir veikta 3 vai vairāk reižu (15).

Attiecīgā un zinātniski pamatotā gadījumā, kā arī gadījumos, kad tas atvieglotu testa savienošanu ar citiem toksicitātes testiem, drīkst izmantot citus devu došanas vai paraugošanas režīmu.

Novērojumi

Katru dienu vismaz reizi dienā, vēlams — vienā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc aplicēšanas, jāizdara vispārēji testa dzīvnieku klīniskie novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri

▼M7

ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra pārtikas patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārliekas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām humāni eitanazē (28). Dažos gadījumos var monitorēt dzīvnieku ķermeņa temperatūru, jo ir pamats domāt, ka apstrādes izraisīta hipertermija un hipotermija var radīt maldinošus rezultātus (32) (33) (34).

Mērķaudu ekspozīcija

Asins paraugi jāņem pienācīgā(-os) laikā(-os), lai būtu iespējams noskaidrot testējamās ķimikālijas līmeni plazmā un gadījumos, kad tas vajadzīgs un citu datu par ekspozīciju nav, varētu pierādīt, ka kaulu smadzeņu ekspozīcija ir notikusi (sk. 48. punktu).

Kaulu smadzeņu/asiņu sagatavošana

Kaulu smadzeņu šūnas parasti iegūst no dzīvnieku augšstilba kaula vai lielkaula tūlīt pēc humānas eitanāzijas. Parasti šūnas izņem, sagatavo un iekrāso ar vispārpieņemtām metodēm. Mazus perifērisko asiņu daudzumus saskaņā ar atbilstīgajām dzīvnieku labturības normām var iegūt, izmantojot metodi, kas testa dzīvniekam ļauj izdzīvot, piemēram, ņemot asinis no astes vēnas vai cita piemērota asinsvada vai veicot sirds punkciju vai paraugošanu no liela asinsvada dzīvnieka eitanāzijas brīdī. Gan uz kaulu smadzeņu, gan perifērisko asiņu eritrocītu gadījumā atkarībā no analīzes metodes šūnas var nekavējoties supravitāli iekrāsot (16) (17) (18), sagatavo uztriepes, ko pēc tam iekrāso apskatīšanai mikroskopā vai pienācīgi fiksē un iekrāso plūsmas citometriskajai analīzei. Lietojot DNS specifisku krāsvielu [piemēram, akridīnoranžo (35) vai *Hoechst* 33258 ar pironīnu Y (36)], iespējams izvairīties no daļas artefaktu, kas saistīti ar DNS nespecifisku krāsvielu izmantošanu. Šī priekšrocība neizslēdz tradicionālo krāsvielu izmantošanu (piem., Gimzas krāsvielu mikroskopiskajai analīzei). Var izmantot arī papildu sistēmas [piem., celulozes kolonnas to šūnu atdalīšanai, kurām ir kodoli (37) (38)], ar nosacījumu, ka ir pierādīts šo sistēmu saderīgums ar paraugu sagatavošanu laboratorijā.

Gadījumos, kad šīs metodes ir izmantojamas, var izmantot antikinetohora antivielu metodi (39), *FISH* ar pancentromēriskām DNS zondēm (40) vai *in situ* iezīmēšanu ar pancentromērpecifiskiem praimeriem kombinācijā ar DNS iekrāsošanu ar kontrasta krāsvielu (41), lai identificētu mikrokodolu īpatnības (hromosomas / hromosomu fragmenti) ar mērķi noteikt, vai mikrokodolu inducēšanās mehānisms ir saistīts ar klastogēnu un/vai ar aneigēnu aktivitāti. Ja ir pierādīta to efektivitāte, var izmantot citas klastogēnu un aneigēnu diferenciācijas metodes.

Analīze (manuāla un automātiska)

Visi analizējamie priekšmetstikliņi vai paraugi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, pirms jebkāda veida analīzes neatkarīgi jākodē un jārandomizē, lai manuālajam vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti; tāda kodēšana nav jāveic, ja izmanto automātiskās novērtēšanas sistēmas, kurās neveic vizuālu apskati un kuras nevar ietekmēt operatora neobjektivitāte. Katram dzīvniekam nosaka nenobriedušo eritrocītu skaita attiecību pret eritrocītu kopējo skaitu (nenobriedušie + nobriedušie), saskaitot vismaz 500 eritrocītus, ja izmanto kaulu smadzenes, un vismaz 2 000 eritrocītus, ja izmanto perifēriskās asinis (42). Lai noteiktu mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu biežumu, novērtē vismaz 4000 nenobriedušu mikrokodolus saturošu eritrocītu no katra dzīvnieka

▼M7

(43). Ja vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes dati liecina, ka vidējais mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu fona biežums testējošajā laboratorijā ir < 0,1 %, jāapsver papildu šūnu novērtēšana. Analizējot paraugus, nenobriedušo eritrocītu īpatsvars attiecībā pret kopīgo eritrocītu skaitu apstrādātajos dzīvniekos nedrīkst būt mazāks par 20 % no nesēja/šķīdinātāja kontroles īpatsvara, ja uzskaiti veic ar mikroskopu, un nedrīkst būt mazāks par apmēram 5 % no nesēja/šķīdinātāja kontroles īpatsvara, ja CD71+ nenobriedušos eritrocītus novērtē ar citometriskām metodēm (sk. 31. punktu) (29). Piemēram, ja kaulu smadzeņu testā, kurā novērtēšanu veic ar mikroskopu, nenobriedušo eritrocītu kontroles īpatsvars kaulu smadzenēs ir 50 %, toksicitātes augšējā robeža būtu 10 % nenobriedušu eritrocītu.

Tā kā žurku liesa mikrokodolus saturošus eritrocītus izolē un iznīcina, lai žurku perifērisko asiņu analīzē saglabātu augstu testa jutību, vēlams analizēt tikai mikrokodolus saturošo nenobriedušo eritrocītu jaunāko frakciju. Izmantojot automātiskas analīzes metodes, nenobriedušākos eritrocītus iespējams identificēt, pamatojoties uz to augsto RNS saturu vai augsto transferīna receptoru (CD71+) līmeni uz virsmas (31). Tomēr dažādu iekrāsošanas metožu tiešā salīdzināšanā konstatēts, ka apmierinošus rezultātus iespējams iegūt ar dažādām metodēm, tostarp ar tradicionālo iekrāsošanu ar akridīnoranžo (3) (4).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulā. Katram analizējamajam dzīvniekam atsevišķi norāda novērtēto nenobriedušo eritrocītu skaitu, nenobriedušo mikrokodolus saturošo eritrocītu skaitu un nenobriedušo eritrocītu īpatsvaru attiecībā pret visiem eritrocītiem. Ja peles nepārtraukti apstrādā 4 nedēļas vai ilgāk, jāsniedz arī dati par nobriedušo mikrokodolus saturošo eritrocītu skaitu un īpatsvaru, ja tādi dati tiek iegūti. Jāziņo arī dati par dzīvniekiem novēroto toksicitāti un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

a. paralēlās negatīvās kontroles dati tiek uzskatīti par pieņemamiem iekļaušanai laboratorijas vēsturisko kontroļu datubāzē (sk. 15.–18. punktu);

b. paralēlās pozitīvās kontroles vai novērtēšanas kontroles inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli (sk. 24.–25. punktu);

c. ir analizēts pienācīgs devu un šūnu skaits;

d. lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 30.–33. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par vienozīmīgi pozitīvu, ja:

a. vismaz vienai no apstrādes grupām novērojams statistiski nozīmīgs nenobriedušu mikrokodolus saturošu eritrocītu biežuma pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

b. šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz vienā paraugošanas reizē ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu; un

c. kāds no šiem rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

▼M7

Ja konkrētajā paraugošanas laikā tiek izvērtēta tikai lielākā deva, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja novērojams statistiski nozīmīgs pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli un rezultāti atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma). Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (44) (45) (46) (47). Veicot devas–atbildreakcijas analīzi, jāanalizē vismaz trīs apstrādātās devu grupas. Statistikas testos eksperimenta vienība ir dzīvnieks. Pozitīvi mikrokodolu testa rezultāti liecina, ka testējamās ķimikālijas ietekmē hromosomu bojājumu vai mitotiskā aparāta bojājumu rezultātā testā izmantotās sugas dzīvnieku eritroblastos veidojas mikrokodoli. Ja tika veikts tests centromēru detektēšanai mikrokodolos, testējamā ķimikālija, kas rada centromērus saturošus mikrokodolus (centromēriska DNS vai kinetohors norāda uz visas hromosomas zudumu), kalpo par pierādījumu tam, ka testējamā ķimikālija ir aneigēns.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos:

a. nevienai no apstrādes grupām nav novērojams statistiski nozīmīgs nenobriedušu mikrokodolus saturošu eritrocītu biežuma pieaugums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

b. to izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, nevienā paraugošanas reizē nav konstatējama pieauguma sakarība ar devu;

c. visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma) un

d. kaulu smadzenes ir bijušas eksponētas testējamai(-ām) ķimikālijai(-ām).

Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (44) (45) (46) (47). Par kaulu smadzeņu eksponētību testējamajai ķimikālijai var liecināt, piemēram, nenobriedušo/nobriedušo eritrocītu attiecības samazināšanās vai testējamās(-o) ķimikālijas(-u) līmeņa mērījums plazmā vai asinīs. Intravenozas ievadīšanas gadījumā pierādījumi par eksponētību nav nepieciešami. Alternatīvi kaulu smadzeņu eksponētības pierādīšanai var izmantot *ADME* datus, kas iegūti neatkarīgā pētījumā, kurā izmantots tas pats ceļš un tā pati suga. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testējamā ķimikālija testa sugas dzīvniekos neinducē mikrokodolu veidošanos nenobriedušos eritrocītos.

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai viennozīmīgi negatīvu atbildreakciju verificēt.

Gadījumos, kad atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai pozitīva, lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu (piem., vājš vai neskaidrs pieaugums), dati jānovērtē ekspertam un/vai jāpabeidz esošo eksperimentu sīkāka izskatīšana. Dažos gadījumos varētu būt lietderīgi analizēt lielāku skaitu šūnu vai veikt atkārtotu eksperimentu, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus.

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas dati neļauj secināt, ka testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka pētījuma rezultāts ir neskaidrs.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

▼M7

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma.

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,

— barības, dzeramā ūdens vai inhalāciju preparātu sagatavošana,

— analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tie izdarīti.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana u. c.,

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode,

— īstermiņa pētījumiem: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās; pētījumiem, kas notiek ilgāk par nedēļu: katra dzīvnieka svars un pārtikas patēriņš pētījuma laikā. Iekļauj katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas apstākļi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati,

— diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts,

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas ievadīšanu,

— izvēlētā ievadīšanas ceļa un ilguma pamatojums,

— metodes, kā verificēts, ka testējamā(-s) ķimikālija(-s) nonākusi(-šas) vispārējā asinsritē vai kaulu smadzenēs,

▼M7

— faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— eitanāzijas paņēmiens,

— atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota),

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— paraugu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē mikrokodolus saturošus nenobriedušus eritrocītus,

— mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu biežuma noteikšanai un nenobriedušo/nobriedušo eritrocītu attiecības noteikšanai analizēto katra dzīvnieka šūnu skaits,

— pētījuma pieņemamības kritēriji,

— metodes, piem., antikinetohoru antivielu vai centromērspecifisku DNS zonžu metode, ar kurām noteikts, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā).

Rezultāti:

— dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksicitātes pazīmes,

— nenobriedušu eritrocītu īpatsvars attiecībā pret eritrocītu kopējo skaitu,

— mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu skaits par katru dzīvnieku atsevišķi,

— mikrokodolus saturošu nenobriedušu eritrocītu vidējais skaits ± standartnovirze katrā grupā,

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība,

— izmantotā statistiskā analīze un metodes,

— paralēlo negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības, standartnovirzes un 95 % kontroles robežas sadalījumam, kā arī aptvertais laikposms un novērojumu skaits,

— kaulu smadzeņu eksponētību apliecinoši dati,

— raksturojoši dati, kas norāda, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā),

— izpildītie pozitīvas vai negatīvas atbildreakcijas kritēriji.

▼**M7**

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Atsauces.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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) 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Centromērs: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Eritroblasts: šūna, kura joprojām satur kodolu, agrīnā eritrocīta attīstības posmā tieši pirms pārveidošanās par nenobriedušu eritrocītu.

Kinetohors: proteīnstruktūra, kas veidojas uz eikariotisku šūnu centromēra, mitozes un mejozes laikā savieno hromosomu ar mitozes vārpstas mikrocaurulīšu polimēriem un šūnu dalīšanās laikā atdala māshromatīdas.

Mikrokodoli: mazi kodoli, kas mitozes (mejozes) telofāzē izveidojas no aizkavējušos hromosomu fragmentiem vai veselām hromosomām atsevišķi no šūnu galvenajiem kodoliem un tiem papildus.

Normohromatocīts jeb nobriedis eritrocīts: pilnīgi nobriedis eritrocīts, kam vairs nav pēc enukleācijas atlikušās RNS un/vai citu īslaicīgu šūnu marķieru, kuriem ir raksturīgi izzust pēc enukleācijas, kas notiek pēc galīgās eritroblasta dalīšanās.

Polihromatocīts jeb nenobriedis eritrocīts: jaunizveidojies eritrocīts attīstības vidējā posmā, kas iekrāsojas gan ar zilajām, gan sarkanajām klasisko asins krāsvielu, piem., Raita–Gimzas krāsvielas, daļām, jo jaunajā šūnā vēl ir RNS atlikums. Tādas jaunizveidojušās šūnas ir apmēram tādas pašas kā retikulocīti, kurus vizualizē, izmantojot vitālās krāsvielas, kas RNS liek sabiezēt retikulā. Jaunizveidojušos sarkano asinsķermenīšu identificēšanai mūsdienās bieži izmanto citas metodes, tostarp RNS monohromatisku iekrāsošanu ar fluorescējošām krāsvielām vai īslaicīgu virsmas marķieru, piemēram, CD71, iezīmēšanu ar fluorescējošām antivielām. Polihromatocīti, retikulocīti un CD71-pozitīvi eritrocīti visi ir nenobrieduši eritrocīti, bet katram no tiem ir mazliet atšķirīga attīstības pakāpe.

Retikulocīts: jaunizveidojies eritrocīts, iekrāsots ar vitālo krāsvielu, kas atlikušajai šūnu RNS liek sabiezēt raksturīgā retikulā. Retikulocītiem un polihromatocītiem ir līdzīgas šūnu attīstības pakāpes.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M7

2. papildinājums

FAKTORĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI *IN VIVO* MIKROKODOLU TESTĀ

Faktoriālais plāns un tā analīze

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkotie efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., *SPSS*, *SAS*, *STATA*, *Genstat*, kā arī izmantojot *R*.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsauces) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgrīkos.

Analīzi turpina, *ANOVA* tabulā ([1]) apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz *ANOVA* grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastus visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi dod iespēju pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto "Eksperimentu plānošanas" ("Design of Experiment") metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmeļošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

([1]) Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models* (*GLM*), var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto *ANOVA* tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

▼**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 & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc;

▼B

B.13./14. **MUTAGENITĀTE – BAKTĒRIJU REVERSĀS MUTĀCIJAS**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO TG 471 metodes "Baktēriju reversās mutācijas tests" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Baktēriju reversās mutācijas testā, lai noteiktu konkrētas mutācijas, pie kurām pieder vienas vai vairāku DNS bāzu pāru aizstāšana, pievienošana vai izslēgšana, izmanto *Salmonella typhimurium* un *Escherichia coli* celmus, kam vajadzīgas aminoskābes (1) (2) (3). Šā baktēriju reversās mutācijas testa princips ir tāds, ka ar to nosaka mutācijas, kas izlabo testam izmantojamo celmu mutācijas un atjauno baktēriju funkcionālās spējas sintezēt neaizstājamās aminoskābes. Reversās baktērijas nosaka pēc to augšanas spējas bez aminoskābēm, kas vajadzīgas mātes kontrolcelmam.

Noteiktas mutācijas ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir pierādīts, ka tās somatiskajās šūnās rada onkogēnu un tumorsupresoro gēnu izmaiņas, izraisot vēzi cilvēkiem un izmēģinājumu dzīvniekiem. Baktēriju reversās mutācijas tests ir ātrs, lēts un diezgan vienkāršs. Daudziem kontrolcelmiem ir vairākas īpatnības, kuru dēļ tie ir jutīgāki mutāciju noteikšanai, ieskaitot atbilstošus DNS posmus reversijas vietās, lielu molekulu caurlaidības palielināšanos šūnās un DNS reparācijas sistēmu izslēgšanu vai nejaušas DNS pasivitātes pastiprināšanās procesus. Kontrolcelmu specifiskās īpašības var sniegt noderīgu informāciju par mutāciju veidiem, ko izraisa genotoksiskas vielas. Ļoti plaša datubāze ir uzkrāta par baktēriju reversās mutācijas testu rezultātiem daudzām un dažādām struktūrām, un ir labi izstrādātas metodikas ķīmisko vielu pārbaudēm ar dažādām fizikāli ķīmiskajām īpašībām, ieskaitot viegli gaistošus savienojumus.

Skatīt arī vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Reversās mutācijas testā ar *Salmonella typhimurium* vai *Escherichia coli* nosaka tāda celma mutāciju, kam vajadzīga aminoskābe (attiecīgi – histidīns vai triptofāns), par celmu, kam nav vajadzīga aminoskābe no ārēja avota.

Mutagēni, kas izraisa bāzu pāra aizvietošanu: vielas, kuras izraisa DNS bāzu izmaiņas. Reversijas testā šīs mutācijas var notikt sākotnējās mutācijas vietā vai bakteriālā genoma citā vietā.

Mutagēni, kas izraisa olbaltuma sintēzes nolasīšanas fāzes nobīdi: vielas, kuras izraisa DNS viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanu vai izslēgšanu, tādējādi izmainot RNS nolasīšanu.

▼B

1.3. SĀKOTNĒJI APSVĒRUMI

Baktēriju reversās mutācijas testā izmanto prokariotu šūnas, kas atšķiras no zīdītāju šūnām pēc tādiem faktoriem kā izmantošana, metabolisms, hromosomu struktūra un DNS reparācijas procesi. Testiem, ko izdara *in vitro*, metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēns avots. Šāda metaboliskas aktivācijas sistēma nevar pilnībā imitēt apstākļus zīdītāju organismā *in vivo*. Tāpēc tests nedod tiešu informāciju par mutagēnu un kancerogēnu iedarbību uz zīdītājiem.

Baktēriju reversās mutācijas testu parasti izmanto vielas sākotnējai genotoksiskas aktivitātes novērtēšanai, un jo īpaši noteiktu mutāciju izraisīšanas aktivitātes noteikšanai. Plaša datubāze liecina, ka daudzas šajā testā pozitīvas ķīmiskās vielas uzrāda mutagēnu aktivitāti arī citos testos. Tomēr ir gadījumi, kad šajā testā netiek konstatēts, ka vielai ir mutagēnas īpašības; šā trūkuma iemesli saistāmi ar nosakāmā parametra īpašo raksturu, kā arī metabolisma aktivācijas vai bioloģiskās pieejamības atšķirībām. Savukārt faktori, kas palielina baktēriju reversās mutācijas testa jutību, var veicināt vielu mutagēnās aktivitātes pārvērtēšanu.

Baktēriju reversās mutācijas tests var nebūt piemērots noteiktām ķīmisko vielu grupām piederīgu savienojumu novērtēšanai, piemēram, tādu savienojumu mutagēnās aktivitātes novērtēšanai, kuriem ir izteikti baktericīdas īpašības (piemēram, dažas antibiotiskās vielas), kā arī savienojumiem, par kuriem ir pamats uzskatīt (vai ir noskaidrots), ka tie ietekmē tikai zīdītāju šūnu replikācijas sistēmu (piemēram, daži topoizomerāzes inhibitori un nukleozīdu analogi). Šādos gadījumos piemērotāki ir mutācijas testi, kuriem izmanto zīdītāju šūnas.

Lai gan daudzi savienojumi, kam šis tests ir pozitīvs, ir zīdītājiem kancerogēni, tomēr šī korelācija nav absolūta. Tā atkarīga no ķīmisko vielu grupas, pie kuras pieder pārbaudāmais savienojums, un ir kancerogēni, ko šajā testā noteikt nevar, jo to iedarbībai ir cits mehānisms, kas nav saistīts ar genotoksicitāti un kura nav baktēriju šūnās.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Baktēriju šūnu suspensijas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ar ietveršanas metodi platē šīs suspensijas sajauc ar augšējā slāņa agaru, ar ko nekavējoties pārklāj nelielu barotnes daudzumu. Ar preinkubācijas metodi apstrādēs maisījumu inkubē un pēc tam sajauc ar augšējā slāņa agaru, ar ko pārklāj nelielu barotnes daudzumu. Pēc divas vai trīs dienas ilgas inkubācijas saskaņā ar abām metodēm revertantās kolonijas skaita un salīdzina ar to revertanto koloniju skaitu, kas spontāni izveidojušās uz šķīdinātāja kontrolplatēm.

Aprakstītas vairākas baktēriju reversās mutācijas testa procedūras. Pie plašāk izmantotajām pieder ietveršanas metode platē (1) (2) (3) (4), preinkubācijas metode (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuācijas metode (9) (10) un suspensijas metode (11). Aprakstītas metodes modifikācijas gāzveida vai gaistošu vielu testēšanai (12).

▼B

Metodē aprakstītās procedūras pirmām kārtām attiecas uz platē ietveršanas un preinkubācijas metodēm. Tās abas ir piemērotas izmēģinājumiem gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās. Daļu vielu var labāk noteikt ar preinkubācijas metodi. Šie savienojumi pieder pie tādām ķīmisko vielu grupām kā alifātiskie nitrozoamīni ar īsu ķēdi, divvērtīgie metāli, aldehīdi, azokrāsvielas un diazosavienojumi, pirolizidīna alkaloīdi, alilsavienojumi un nitrosavienojumi (3). Atzīts arī, ka dažas mutagēnu klases ne vienmēr var atklāt, izmantojot standarta procedūras, piemēram, ietveršanas metodi platē vai preinkubācijas metodi. Tās būtu uzskatāmas par "īpašiem gadījumiem", un to atklāšanai noteikti jāizmanto citas alternatīvas procedūras. Var izdalīt šādus "īpašus gadījumus" (kopā ar procedūrām, ko var izmantot to atklāšanai): azokrāsvielas un diazosavienojumi (3) (5) (6) (13), gāzveida un gaistošas vielas (12) (14) (15) (16) un glikozīdi (17) (18). Atkāpes no standarta procedūras zinātniski jāpamato.

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Sagatavošana**

1.5.1.1. *Baktērijas*

Svaigas baktēriju kultūras izaudzē līdz eksponenciālās fāzes beigām vai stacionārās fāzes sākumam (aptuveni 10^9 šūnas mililitrā). Neizmanto kultūras, kas ir stacionārās fāzes beigās. Būtiski, lai izmēģinājumiem izmantojamajām kultūrām būtu augsts dzīvotspējīgo baktēriju titrs. Titru var novērtēt pēc vēsturiskajiem kontroles datiem par augšanas līknēm vai katrā analīzē nosakot dzīvotspējīgo šūnu skaitu ar pārklāšanas eksperimentu.

Ieteicamā inkubēšanas temperatūra ir 37 °C.

Izmanto vismaz piecus baktērijas celmus. No tiem četriem jābūt *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537; TA97a vai TA97; TA98; un TA100), jo pierādīts, ka ar tiem iegūst drošus un dažādās laboratorijās atkārtojamus rezultātus. Šiem četriem *S. typhimurium* celmiem primārās reversijas vietā ir GC bāzu pāri, un noskaidrots, ka ar tiem nevar atklāt dažus oksidējošus mutagēnus, sašūtus aģentus un hidrazīnus. Šīs vielas var detektēt ar *E. coli* WP2 celmiem vai *S. typhimurium* TA 102 (19), kuriem primārās reversijas vietā ir AT bāzu pāris. Tāpēc ieteicamā izmantojamo celmu kombinācija ir:

— *S. typhimurium* TA1535 un

— *S. typhimurium* TA1537 vai TA97, vai TA97a, un

— *S. typhimurium* TA98, un

— *S. typhimurium* TA100, un

— *E. coli* WP2 uvrA vai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), vai *S. typhimurium* TA102.

Oksidējošu mutagēnu atklāšanai var būt vēlams izmantot TA102 vai pievienot kādu DNS reparācijas *E. coli* celmu (piemēram, *E. coli* WP2 vai *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Rezerves kultūru pagatavošanai, marķeru verificēšanai un glabāšanai izmanto labi izstrādātas procedūras. Aminoskābju nepieciešamība augšanai jāparāda katrai saldētajai rezerves kultūrai (triptofāna vajadzību *S. typhimurium* celmiem, bet *E coli* celmiem triptofāna vajadzību). Līdzīgi pārbauda arī citas fenotipa īpašības, proti, gadījumos, kad tas ir vajadzīgs, R-faktora plazmīdu klātbūtni vai trūkumu (t. i., rezistenci pret ampicilīnu TA98, TA100 un TA97a vai TA97, WP2 uvrA un WP2 uvrA (pKM101) celmiem, bet rezistenci pret ampicilīnu un tetraciklīnu TA102 celmam); raksturīgās mutācijas (t. i., rfa mutāciju *S. typhimurium* pēc jutības uz kristālvioleto un uvrA mutāciju *E. coli* vai uvrB mutāciju *S. typhimurium* pēc jutības uz ultravioleto gaismu) (2) (3). Celmiem jādod arī revertantās kolonijas ar parādīšanās biežumu, kas atbilst laboratorijas vēsturiskajiem kontroles datiem, un vēlams, lai tas būtu literatūrā minētajās robežās.

1.5.1.2. *Barotne*

Izmanto piemērotu minimālo agaru (kas satur, piemēram, Fogeļa–Bonera (*Vogel-Bonner*) minimālo barotni E un glikozi) un augšējā slāņa agaru, kas satur histidīnu un biotīnu vai triptofānu dažiem šūnu dalīšanās cikliem vajadzīgajā daudzumā (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolisma aktivācija*

Baktērijas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Plašāk izmantojamā aktivācijas sistēma ir ar kofaktoru papildināta pēcmitohondriskā frakcija (S9), ko pagatavo no grauzēju aknām, kas apstrādātas ar enzīmstimulējošām vielām, piemēram, *Aroclor* 1254 (1) (2), vai fenobarbitona un β-naftoflavona maisījumu (18) (20) (21). Pēcmitahondrālo frakciju parasti izmanto S9 maisījumā koncentrācijā no 5 līdz 30 tilp. %. Metabolisma aktivācijas sistēmas izvēle var būt atkarīga no ķimikāliju grupas, pie kuras pieder testa viela. Dažos gadījumos pēcmitohondriskā frakcija var būt jālieto vairākās koncentrācijās. Azokrāsvielu un diazosavienojumu pārbaudēm var būt piemērotāka metabolisma aktivācijas sistēma ar reducējošām īpašībām (6) (13).

1.5.1.4. *Testa viela/preparāts*

Pirms baktēriju apstrādes ar cietām testa vielām, tās vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var tieši pievienot testa sistēmā un/vai pirms šūnu apstrādes atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

Šķīdinātājs vai nesējs nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu, un tas nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt baktēriju dzīvotspēju un S9 aktivitāti (22). Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus. Pārbaudot ūdens vidē nestabilas vielas, izmanto bezūdens organiskos šķīdinātājus.

▼B

1.5.2. **Testa apstākļi**

1.5.2.1. *Testam izmantojamie celmi (skatīt 1.5.1.1.)*

1.5.2.2. *Pārbaudāmās koncentrācijas*

Viens no kritērijiem, kas jāņem vērā, nosakot lielāko izmantojamās testa vielas daudzumu, ir tās citotoksicitāte un šķīdība galīgajā apstrādes maisījumā.

Var būt lietderīgi iepriekšējā eksperimentā noteikt vielas toksicitāti un šķīdību. Citotoksicitāti var noteikt pēc revertanto koloniju skaita samazināšanās, fona pazušanas vai samazināšanās vai pēc apstrādāto kultūru izdzīvošanas pakāpes. Vielas citotoksicitāte var mainīties metabolisma aktivācijas sistēmu klātbūtnē. To, ka viela ir nešķīstoša, novērtē pēc tās izgulsnēšanās, kas redzama ar neapbruņotu aci, galīgajā maisījumā testa faktiskajos apstākļos.

Ieteicamā maksimālā testa koncentrācija vielām, kas nav citotoksiskas, ir 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati. Vielām, kas nav citotoksiskas un nav šķīstošas – 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati, vienā vai vairākās pārbaudāmajās koncentrācijās jābūt nešķīstošām galīgajā apstrādes maisījumā. Testa vielas, kas ir citotoksiskas jau zem 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati, pārbauda koncentrācijās, kas ir mazākas par citotoksisko koncentrāciju. Neizšķīdušas vielas klātbūtne nedrīkst traucēt skaitīšanu.

Sākotnējā izmēģinājumā vielu pārbauda vismaz piecās analizējamās koncentrācijās ar apmēram puslogaritmiskiem (t. i., maksimāli √10 reizes) intervāliem starp testa punktiem. Var izmantot mazākus koncentrāciju intervālus gadījumos, kad pēta koncentrāciju ietekmi. Var veikt izmēģinājumus ar koncentrācijām, kas pārsniedz 5 mg vai 5 µl uz plati gadījumos, kad testa viela ievērojamā daudzumā satur potenciāli mutagēnus piemaisījumus.

1.5.2.3. *Negatīvas un pozitīvas kontroles*

Katrā eksperimentā gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās vienlaicīgi iekļauj celmam piemērotas pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja vai nesēja) kontroles. Pozitīvai kontrolei izvēlas koncentrācijas, kas ir efektīvas visos izmēģinājumos.

Izmēģinājumos, kuros izmanto metabolisma aktivācijas sistēmas, standartvielu(-as) pozitīvai kontrolei jāizvēlas atbilstīgi lietoto baktēriju celma tipam.

Izmēģinājumos ar metabolisma aktivāciju pozitīvai kontrolei ir piemērotas šādas vielas:

CAS Nr.	*Einecs* Nr.	Viela
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracēns
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenzantracēns
50-32-8	200-028-5	benzopirēns
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracēns

▼B

CAS Nr.	*Einecs* Nr.	Viela
50-18-0		ciklofosfamīds
6055-19-2	200-015-4	ciklofosfamīda monohidrāts

Izmēģinājumiem ar reducējošās metabolisma aktivācijas metodi pozitīvai kontrolei ir piemērota šāda viela:

CAS Nr.	*Einecs* Nr.	Viela
573-58-0	209-358-4	Kongo sarkanais

Kā vienīgo S9 maisījuma iedarbības indikatoru nevar izmantot 2-aminoantracēnu. Gadījumos, kad izmanto 2-aminoantracēnu, katrs S9 paraugs jāraksturo arī ar mutagēnu, kam vajadzīga metabolisma aktivācija ar mikrosomu fermentiem, piemēram, ar benzopirēnu vai dimetilbenzantracēnu.

Izmēģinājumos bez eksogēnas metabolisma aktivācijas sistēmas celmam specifiskai pozitīvai kontrolei ir piemērotas šādas vielas:

CAS Nr.	*Einecs* Nr.	Viela	Celms
26628-22-8	247-852-1	nātrija azīds	TA 1535 un TA 100
607-57-8	210-138-5	2- nitrofluorēns	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridīns	TA 1537, TA 97 un TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 un TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumola hidroperoksīds	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicīns C	WP2 uvrA un TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidīns	WP2, WP2uvrA un WP2uvrA (pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrohinolīn-1-oksīds	WP2, WP2uvrA un WP2uvrA (pKM101)
3688-53-7		furilfuramīds (AF2)	Plazmīdus saturoši celmi

Pozitīvai kontrolei var izmantot arī citas piemērotas standartvielas. Ja iespējams, kā pozitīvās kontroles vielas jāizmanto ķīmiskas vielas, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām.

Jāiekļauj negatīvas kontroles, kurās ietilpst tikai šķīdinātājs vai nesējs un kurās nav testa vielu; ar tām rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes grupām. Turklāt jāizmanto arī tukšie mēģinājumi, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam nav kaitīgas mutagēnas iedarbības.

▼B

1.5.3. **Procedūra**

Pēc iekļaušanas platē metodes (1) (2) (3) (4) bez metabolisma aktivācijas parasti ņem 0,05 ml vai 0,1 ml testa vielas šķīduma, 0,1 ml svaigas baktēriju kultūras (kurā ir apmēram 10^8 dzīvotspējīgas šūnas) un 0,5 ml sterila buferšķīduma, ko sajauc ar 2,0 ml augšējā slāņa agara. Izmēģinājumiem ar metabolisma aktivāciju parasti ņem 0,5 ml metabolisma aktivācijas maisījuma, kurā ir vajadzīgais daudzums pēcmitohondriskās frakcijas (metabolisma aktivācijas maisījumā koncentrācijā no 5 līdz 30 tilp. %), ko kopā ar baktērijām un testa vielu vai tās šķīdumu sajauc ar augšējā slāņa agaru (2,0 ml). Mēģeņu saturu sajauc un izlej mazās agara platēs. Pirms inkubācijas augšējā slāņa agaram ļauj sacietēt.

Ar preinkubācijas metodes (2) (3) (5) (6) testa vielu vai tās šķīdumu parasti vispirms vismaz 20 minūtes inkubē 30–37 °C temperatūrā kopā ar testam izmantojamo celmu (kas satur apmēram 10^8 dzīvotspējīgas šūnas) un sterilu buferšķīdumu vai metabolisma aktivācijas sistēmu (0,5 ml), ko pēc tam sajauc ar augšējā slāņa agaru un izlej mazās agara platēs. Parasti 2,0 ml augšējā slāņa agara sajauc ar 0,05 vai 0,1ml testa vielas vai testa šķīduma, 0,1 ml baktēriju un 0,5 ml S9 maisījuma vai sterila buferšķīduma. Preinkubācijas laikā mēģenēm jāveic aerācija, lietojot kratītāju.

Pareizai variāciju novērtēšanai visas devas pārbauda trijos atkārtojumos. Izmēģinājumu var veikt divos atkārtojumos gadījumos, kad tam ir zinātnisks pamatojums. Kādas plates zaudējuma dēļ izmēģinājums nav uzskatāms par nederīgu.

Gāzveida un gaistošu vielu pārbaudēm izmanto atbilstošas metodes, piemēram, kultivēšanu hermētiski noslēgtos traukos (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubēšana**

Visas viena izmēģinājuma plates inkubē 48–72 stundas 37 °C temperatūrā. Pēc inkubēšanas nosaka revertanto koloniju skaitu uz katras plates.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Rezultātus izsaka ar revertanto koloniju skaitu uz plati. Norāda arī revertanto koloniju skaitu gan uz negatīvās kontroles (uz šķīdinātāja kontroles un, ja izmantota, arī tukšā mēģinājuma), gan arī uz pozitīvās kontroles platēm. Testa vielai, pozitīvajai un negatīvajai (neapstrādātai un/vai šķīdinātāju) kontrolei norāda revertanto koloniju skaitu uz platēm, to vidējo skaitu un standartnovirzes.

Nav noteiktu prasību attiecībā uz pozitīvas reakcijas verificēšanu. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot atkārtoti pārbaudi, turklāt vēlams mainīt eksperimenta apstākļus. Negatīvi rezultāti katrā konkrētā gadījumā ir jāapstiprina. Gadījumos, kad negatīvu rezultātu apstiprināšanu uzskata par nevajadzīgu, tas ir jāpamato. Izmaiņas eksperimenta apstākļu parametros novērtē un nosaka papildu eksperimentos. Eksperimenta parametri, kurus var mainīt, ir pārbaudāmo koncentrāciju atšķirības, apstrādes metode (ietveršana platē vai šķidruma preinkubācija) un metabolisma aktivācijas apstākļi.

▼B

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, piemēram, atkarībā no koncentrācijas – pēc revertanto koloniju skaita palielināšanās uz plati vai pēc vismaz viena celma revertanto koloniju skaita reproducējamas palielināšanās ar metabolisma aktivācijas sistēmu vai bez tās (23). Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli testu rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes (24). Tomēr statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Uzskata, ka testa vielas mutagēnās īpašības nav konstatētas, ja tās testa rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvi baktēriju reversās mutācijas testa rezultāti liecina, ka testa viela izraisa *Salmonella typhimurium* un/vai *Escherichia coli* noteiktas mutācijas ar bāzu aizvietošanu vai olbaltuma sintēzes nolasīšanas fāzes nobīdi genomā. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testa viela neizraisa mutācijas pārbaudītajām sugām.

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

Šķīdinātājs/nesējs:

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Celmi:

— izmantotie baktēriju celmi,

— šūnu skaits kultūrā,

— celmu raksturojums.

Testa apstākļi:

— testa vielas daudzums uz vienu plati (mg/platē vai µl/platē), pamatojot izvēlēto devu un vienas koncentrācijas pārbaudei ņemto plašu skaitu,

— izmantotā barotne,

— metabolisma aktivācijas sistēmas veids un sastāvs, norādot pieņemamības kritērijus,

— apstrādes procedūras.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— izgulsnēšanās pazīmes,

— koloniju skaits uz katras plates,

▼B

— vidējais revertanto koloniju skaits uz plati un standartnovirze,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347–364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, p. 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, p. 13–61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, p. 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, p. 33–42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (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, p. 453–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, p. 335–344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, p. 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, p. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 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, p. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, p. 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, p. 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, p. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated 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, p. 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, p. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, p. 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, p. 83–91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, 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, p. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR GĒNIEM HPRT UN XPRT

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 476 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī pašreizējā pārstrādātā TM B.17 versija atspoguļo gandrīz trīsdesmitgadīgu pieredzi šā testa veikšanā un arī rezultātus, kas gūti, izstrādājot atsevišķu jaunu metodi zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testiem, kuros izmanto timidīna kināzes gēnu. TM B.17 pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas mutācijas, kas notiek ar reportiergēniem — endogēnisko hipoksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes gēnu (grauzēju šūnu Hprt, cilvēka šūnu HPRT; šajā testēšanas metodes aprakstā tie apvienoti saukti par gēnu Hprt un HPRT testu) un ksantīna–gvanīna fosforiboziltransferāzes transgēnu (gpt) (tas saukts par XPRT testu). HPRT un XPRT mutāciju testi detektē dažāda spektra ģenētiskus notikumus. Papildus ar šo HPRT testu detektētajiem mutatīvajiem notikumiem (piem., bāzu pāra maiņas mutācijām, nolasīšanas fāzes nobīdēm, mazām delēcijām un insercijām) transgēna gtp autosomālā lokalizācija var dot iespēju detektēt mutācijas, kas radušās no lielām HRPT testā nedetektētām delēcijām un varbūt arī mitotiskām rekombinācijām, jo gēns Hprt atrodas X hromosomā (2) (3) (4) (5) (6) (7). Regulatīviem nolūkiem pašlaik XPRT izmanto mazāk nekā HPRT testu.

3. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēnisks avots. Eksogēniskā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.

5. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testēšanas sistēmu), kas novestu pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada tieša testējamo ķimikāliju un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas (8) (9) (10), mijiedarbība ar barotnes komponentiem (11) (12) vai pārāk augsti citotoksicitātes līmeņi (13). HPRT testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 19. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksicitātes līmeņus.

▼**M8**

6. Pirms šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz maisījumu, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

7. Mutantšūnas, kurām Hprt fermenta darbība HPRT testā vai xprt fermenta darbība XPRT testā neizpaužas, ir rezistentas pret purīna analoga 6-tiogvanīna (TG) citostatisko ietekmi. Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) standartšūnas ir jutīgas pret TG, kurš inhibē šūnu vielmaiņu un šūnām aptur tālāku dalīšanos. Tātad mutantšūnas TG klātbūtnē spēj proliferēt, turpretī normālas šūnas, kas satur Hprt (HPRT testā) vai gpt (XPRT testā) fermentu, to nespēj.

8. Šūnas, kas ir suspensijā vai vienslāņa kultūrās, uz piemērotu laiku (3–6 stundām) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 14. punktu) eksponē testējamajai ķimikālijai, bet pēc tam kultivē apakškultūrās, lai varētu noteikt citotoksicitāti un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija (14), (15), (16), (17). Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvās izdzīvotības (*RS*), t. i., pēc klonēšanās efektivitātes, ko izmēra tūlīt pēc apstrādes un koriģē attiecībā uz jebkādiem apstrādes laikā notikušiem šūnu zudumiem salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (18. punkts un 2. papildinājums). Kultūras, kas apstrādātas, barotnē tur pietiekami ilgu laiku (katra veida šūnām tas ir savs), lai būtu iespējama gandrīz optimāla izraisīto mutāciju fenotipiskā ekspresija (parasti vismaz 7–9 dienas). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot tādā barotnē, kas satur selektīvo līdzekli, ar kuru detektē mutantu kolonijas, un barotnē bez selektīvā līdzekļa, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

9. HPRT un XPRT testiem jāizmanto tādu tipu šūnas, kam apliecināts jutīgums pret ķīmiskiem mutagēniem, augsta klonēšanās efektivitāte, stabils kariotips un stabils spontānu mutantu biežums. Pie HPRT testam visbiežāk izmantotajām šūnām pieder Ķīnas kāmja šūnu CHO, CHL un V79 līnija, peļu limfomas šūnas L5178Y un cilvēka limfoblastu šūnas TK6 (18) (19). No CHO atvasinātās šūnas AS52, kam ir transgēns gpt (bet gēns Hprt ir deletēts), izmanto XPRT testā (20) (21); HPRT testu ar šūnām AS52 nevar veikt, jo hprt gēni ir deletēti. Citu šūnu līniju izmantošana jāpamato un jāvalidē.

10. Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda, vai modālais hromosomu skaits ir stabils un vai nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu (22) (23), un, ja konstatē mikoplazmu vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies, šūnas nav

▼M8

izmantojamas. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem. Jāpārbauda arī spontāno mutantu biežums šūnu izejkultūrā, un, ja tas nav pieņemams, kultūra nav izmantojama.

11. Pirms kultūras izmanto šajā testā, tās var būt jāattīra no jau esošām mutantšūnām, piem., HPRT testa vajadzībām kultivējot HAT barotnē, bet XPRT testa vajadzībām — MPA barotnē (5) (24) (sk. 1. papildinājumu). Attīrītās šūnas iespējams saglabāt krioniski un pēc tam atkausēt, lai izmantotu par darba kultūrām. Tikko atkausētu darba kultūru var sākt testam izmantot, kad sasniegts parastais dubultošanās laiks. Izdarot XPRT testu, parastas šūnu AS52 kultūras gadījumā būtu jāizmanto apstākļi, kas garantē transgēna gpt saglabāšanos (20).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

12. Kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO_2 koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr būtu jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādus kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnām, gan nemutējušām šūnām — optimālu klonēšanās efektivitāti.

Kultūru sagatavošana

13. Šūnu līnijas tiek pavairotas no izejkultūrām, ko kultūras barotnē iesēj tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā šūnas suspensijās vai vienslāņa kultūrās joprojām augtu eksponenciāli (piem., attiecībā uz šūnām vienslāņa kultūrās jāizvairās no konfluences).

Metaboliskā aktivācija

14. Ja strādā ar šūnām, kuru endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar tādām fermentus inducējošām vielām kā *Aroclor 1254* (25) (26) (27) (28) vai fenobarbitāls kombinācijā ar β-naftoflavonu (29) (30) (31) (32). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (33) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat iedarbīga kā *Aroclor 1254* (29) (31). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē koncentrāciju var paaugstināt līdz 10 % (tilp./tilp.). To, kādu eksogēniskās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veidu un koncentrāciju izraugās, var ietekmēt testējamo vielu klase (34) (35) (36).

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

15. Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 16. punktu). Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas vēlams testēt pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (37) (38). Testējamās ķimikālijas preparāti jāpagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

▼M8

TESTA APSTĀKĻI

Šķīdinātāji

16. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai testējamo ķimikāliju šķīdību optimizētu, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piem., nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji, piemēram, ir ūdens un dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organiskajiem šķīdinātājiem parasti nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.), bet šķīdinātājiem uz ūdens bāzes (sālsūdens vai ūdens) — 10 % (tilp./tilp.). Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina, ka tie sader ar testējamo ķimikāliju un ar testa sistēmu un ka izmantotajā koncentrācijā tiem nepiemīt genotoksicitāte. Ja šādu apliecinošu datu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītais šķīdinātājs nerada nekādu deletējošu vai mutagēnisku ietekmi.

Citotoksicitātes mērīšana un ekspozīcijas koncentrāciju izraudzīšanās

17. Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīga citotoksicitāte (sk. 20. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 21. punktu) vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 5. punktu). Ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.

18. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksicitātes un citiem apsvērumiem (sk. 20.–22. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Pat ja citotoksicitāte izvērtēta jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tā joprojām jānosaka katrai kultūrai. Citotoksicitāti izvērtē pēc *RS*, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot pēc negatīvo kontroļu (kurām izdzīvotība ir 100 %) klonēšanās efektivitātes, sk. formulu 2. papildinājumā.

19. Jāizvērtē vismaz četras testa koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot kultūru dublikātus, ar katru testa koncentrāciju var izmantot vai nu replikātus, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar vienas noteiktas koncentrācijas atsevišķajām replikātu kultūrām iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apkopot (17). Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, ar kurām tiek uzrādīta neliela citotoksicitāte vai tās nav, parasti noderēs koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes gadījumā izraudzītajām testa koncentrācijām jāaptver gan koncentrācijas, kuras

▼M8

rada citotoksicitāti, gan koncentrācijas, ar kurām citotoksicitāte ir vidēja, neliela vai tās vispār nav. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksicitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 43. punktu). Izmantot vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši svarīgi, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.

20. Ja maksimālās koncentrācijas pamatā ir citotoksicitāte, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt *RS* diapazonā no 20–10 %. Piesardzīgi būtu jāinterpretē pozitīvi rezultāti, kas konstatēti tikai ar *RS* 10 % vai zemāku (43. punkts).

21. Kas attiecas uz mazšķīstošām testējamām ķimikālijām, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas pārsniedz zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, pie kuras rodas duļķainība vai acīm redzamas nogulsnes, jo nogulsnes var rezultātus ietekmēt artefaktuāli. Darbojoties ar koncentrāciju, pie kuras rodas nogulsnes, būtu jācenšas nodrošināt, ka nogulsnes neietekmē testa izdarīšanu. Var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.

22. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (39) (40). Ja testējamās ķimikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls (t.i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (UVCB)), (41), vides ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var būt jāpalielina (piem, 5 mg/mL), lai būtu panākta augstāka katra komponenta koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (42).

Kontroles

23. Paralēlas negatīvās kontroles (sk. 16. punktu), proti, tikai šķīdinātājs apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām, ir ikviena eksperimenta nosacījums.

24. Lai varētu pierādīt laboratorijas spēju izmantotā testa protokola apstākļos identificēt mutagēnus un — attiecīgā gadījumā — eksogēniskās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti, ir vajadzīgas paralēlas pozitīvās kontroles. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas pamatoti. Tā kā ģenētiski toksikoloģiskie zīdītāju šūnu *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti, testus, kuros izmanto apstrādi ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju un bez tās, drīkst izdarīt tikai ar pozitīvu kontroli, kas prasa metabolisku aktivāciju. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Lai pierādītu testa sistēmas jutīgumu, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 20. punktu).

▼M8

1. tabula

References ķimikālijas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Nosacījums attiecībā uz metabolisko aktivāciju	Lokuss	Viela un *CAS* numurs
Eksogēniska metaboliska aktivācija nenotiek	*Hprt*	Etilmetānsulfonāts [*CAS* Nr. 62-50-0] Etilnitrozurea [*CAS* Nr. 759-73-9] 4-nitrohinolīna 1-oksīds [*CAS* Nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrīns [*CAS* Nr. 3930-19-6] Mitomicīns C [*CAS* Nr. 50-07-7]
Ar eksogēnisku metabolisku aktivāciju	*Hprt*	3-metilholantrēns [*CAS* Nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracēns [*CAS* Nr. 57-97-6] Benz[a]pirēns [*CAS* Nr. 50-32-8]
	xprt	Benz[a]pirēns [*CAS* Nr. 50-32-8]

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķimikāliju

25. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķimikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–6 stundām).

26. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāžām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs katrā kultūrā saglabātos vismaz 10 spontāni mutanti (17). Parasti spontāno mutantu biežums ir 5–20 × 10^{-6}. Lai spontāno mutantu biežums būtu 5 × 10^{-6} un lai pietiekams spontāno mutantu skaits (10 vai vairāk) saglabātos arī kultūrās, ko apstrādes laikā apstrādā ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % *RS*), jāapstrādā vismaz 20 × 10^{6} šūnas. Turklāt pietiekamā skaitā (bet nekādā gadījumā mazāk par 2 miljoniem) jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu selekcijas nolūkā uzsēj uz platēm (17).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un mutantu biežuma mērīšana

27. Pēc apstrādes perioda šūnas kultivē, lai izpaustos mutantu fenotips. Lai notiktu gandrīz optimāla jauninducētu Hprt un xprt mutantu fenotipiskā ekspresija, parasti pietiek ar minimālo laiku 7 līdz 9 dienas (43) (44). Šajā periodā pastāvīgi veido šūnu apakškultūras, lai visu laiku saglabātos eksponenciāla augšana. Kad fenotipiskā ekspresija notikusi, šūnas pārsēj barotnē ar selektīvo līdzekli (6-tiogvanīnu) un bez tā, lai attiecīgi varētu noteikt mutantu skaitu un klonēšanās efektivitāti selekcijas laikā. Šajā pārsēšanā vienslāņa kultūrām var izmantot trauciņus, bet šūnām suspensijā — mikroiedobju plates. Mutantu selekcijas vajadzībām šūnas jāuzsēj tādā blīvumā, lai būtu garantēta optimāla mutantu izguve (proti, lai nevarētu notikt metaboliska sadarbība) (17). Plates inkubē optimālai koloniju augšanai atbilstošu laiku (piem., 7–12 dienas) un kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita, ko koriģē atbilstoši klonēšanās efektivitātei mutantu selekcijas laikā (formulas sk. 2. papildinājumā).

▼M8

Laboratorijas kompetence

28. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas iegūtu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām jābūt tādai, kas ir aktīva ar metabolisku aktivāciju, un vienai — aktīvai bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (izmantojot dažādus šķīdinātājus/nesējus). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāsaskan ar literatūras datiem. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām pieredze jau ir, t. i., kuru rīcībā ir vēsturiska datubāze, kāda aprakstīta 30.–33. punktā.

29. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķimikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas darbībspēju un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu selekcija, kā arī atzīmju likšanas procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu 25. punktā) izlase jāpēta gan bez metaboliskas aktivācijas, gan ar to. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķimikāliju koncentrāciju diapazons, kurā pieaugumi virs fona līmeņa būs reproducējami un ar koncentrāciju saistīti.

Vēsturisko kontroļu dati

30. Laboratorijai jānosaka:

— vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

31. Pirmo reizi iegūstot datus par vēsturisku negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par kontrolēm (22). Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46).

32. Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika "tiek kontrolēta" (46), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (47)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (45).

33. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikātu kultūrās; sk. aprakstu 23. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās (17) (45) (46). Tādus paralēlo negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (sk. augstāk) un nav gadījusies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

▼M8

34. Jebkādas eksperimenta protokola pārmaiņas jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajām vēsturisko kontroļu datubāzēm. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

35. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi citotoksicitātes aprēķināšanai vajadzīgie dati (izteikti kā *RS*). Gan datos par apstrādātajām kontrolēm, gan par kontrolkultūrām jāiekļauj šūnu skaits pēc apstrādes beigām, tūlīt pēc apstrādes uzsēto šūnu skaits un koloniju skaitīšanas rezultāti (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi — tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav). Katras kultūras *RS* ieteicams izteikt kā procentu attiecībā pret paralēlo šķīdinātāja kontroli (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

36. Rezultātu izklāstā jāiekļauj visi mutantu biežuma aprēķināšanai vajadzīgie dati. Gan datos par apstrādātajām kultūrām, gan datos par kontrolkultūrām jāiekļauj: 1) gan ar selekcijas līdzekli, gan bez tā uz platēm uzsēto šūnu skaits (brīdī, kad šūnas uzsēj mutantu selekcijai) un 2) gan attiecībā uz platēm ar selektīvo līdzekli, gan platēm bez selektīvā līdzekļa — saskaitīto koloniju skaits (vai attiecībā uz mikroiedobju metodi, tādu iedobju skaits, kurās koloniju nav) Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantu koloniju skaita (uz platēm ar selektīvu līdzekli), kas koriģēts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (uz platēm bez selekcijas līdzekļa). Mutantu biežums būtu jāizteic kā mutantšūnu skaits uz miljonu dzīvotspējīgu šūnu (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

37. Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

38. Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

— paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 33. punktu;

— paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 24. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli;

— testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (t.i., ar metabolisko aktivāciju un bez tās), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi (sk. 25. punktu);

— šūnas un koncentrācijas bijušas analizējamas pietiekamā skaitā (25., 26. un 19. punkts);

— maksimālās koncentrācijas izraudzīšanās kritēriji atbilst 20., 21. un 22. punktā aprakstītajam.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Ja visi pieņemamības kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju par viennozīmīgi pozitīvu uzskata tad, ja ar kādu no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

▼M8

— vismaz vienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;

— šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu;

— kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 33. punktu).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija kultivētās zīdītāju šūnās spēj izraisīt gēnu mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (46) (48).

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju par viennozīmīgi negatīvu uzskata tad, ja ne ar vieniem no izvērtētajiem eksperimentēšanas nosacījumiem:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums;

— ar attiecīgu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,

— visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 33. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj kultivētās zīdītāju šūnās izraisīt gēnu mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva vai lai varētu labāk noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem (piem., koncentrāciju intervāls, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots]).

43. Retos gadījumos datu kopums pat pēc sīkākas izpētes neļauj izdarīt secinājumu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķimikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

Testēšanas pārskats

44. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināms;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

▼**M8**

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums;

— šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

attiecībā uz laboratorijas pamatkultūrām:

— kultūru tips, šūnu līniju avots;

— pasāžu skaits, ja uzzināms, un to vēsture attiecīgajā laboratorijā;

— kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits;

— šūnu kultūru audzēšanas metodes;

— mikoplazmas neesība;

— šūnu dubultošanās laiks.

Testa nosacījumi:

— koncentrāciju izvēles un kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., citotoksicitātes dati un šķīdības ierobežojumi;

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis;

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM);

— barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums);

— inkubācijas temperatūra;

— inkubācijas laiks;

— apstrādes ilgums;

— šūnu blīvums apstrādes laikā;

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles);

— attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas;

▼M8

— fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku);

— selektīvā līdzekļa identitāte un koncentrācija;

— testu pieņemamības kritēriji;

— dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes;

— citotoksicitātes mērīšanas metodes;

— jebkāda citotoksicitātei un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija;

— inkubācijas laiks pēc uzsēšanas;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs;

— pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits;

— citotoksicitātes mērījumi un citi novērojumi, ja tādi ir;

— izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks;

— selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits;

— koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistento koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums;

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība;

— paralēlās negatīvās (šķīdinātājs) un pozitīvās kontroles dati (koncentrācijas un šķīdinātāji);

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartnovirzēm un ticamības intervālu (piem., 95 %), kā arī datu skaits;

— statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(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) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and 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.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation 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. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and 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., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and 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. Mutation Res., 5841-256.

(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. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and 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. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and 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. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and 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, Mutation 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, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and 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., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 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., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and 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., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott 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. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and 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. and 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). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and 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. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 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, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and 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). 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). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (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.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas kultūras barotnē.

Citotoksicitāte: attiecībā uz testiem, ko aptver šī testēšanas metode, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu relatīvās izdzīvotības samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. attiecīgo punktu).

Turpvērsta mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanos vai izzušanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtojumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

HAT barotne: barotne, kuras sastāvā ir hipoksantīns, aminopterīns un timidīns un kuru izmanto Hprt mutantu attīrīšanai.

Mitotiska rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homoloģisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārtraukumi vai zust heterozigotāte.

MPA barotne: barotne, kuras sastāvā ir ksantīns, adenīns, timidīns, aminopterīns un mikofenolskābe un kuru izmanto Xprt mutantu attīrīšanai.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): konstatēto mutantu koloniju skaits, kas dalīts ar selektīvā barotnē uzsēto šūnu skaitu un pārrēķināts atbilstoši klonēšanās efektivitātei (vai dzīvotspējai) selekcijas laikā.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: tas laiks pēc apstrādes, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējie gēna produkti tiktāl izsīkst, ka mainās arī fenotipiskā pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (*RS*): *RS* izmanto par apstrādes izraisītas citotoksicitātes mēru. *RS* ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (*CE)*, kas pārrēķināta atbilstoši jebkādam šūnu zudumam apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %).

Aknu S9 frakcijas: ar 9 000g centrifugēta aknu homogenāta supernatants, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

▼**M8**

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Neapstrādāta kontrole: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

▼M8

2. papildinājums

CITOTOKSICITĀTES UN MUTANTU BIEŽUMA NOTEIKŠANAS FORMULAS

Citotoksicitāti izvērtē pēc relatīvās izdzīvotības, proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (*CE*), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, *CE* koriģējot atbilstoši negatīvo kontroļu klonēšanās efektivitātei (kurām izdzīvotība ir 100 %), sk. *RS* formulu zemāk.

Koriģēto *CE* ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$\text{Adjusted CE} = \frac{\text{Number of cells at the end of treatment}}{\text{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$\text{RS} = \frac{\text{Adjusted CE in treated culture}}{\text{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutantu biežums ir mutantu koloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē, dalīta ar klonēšanās efektivitāti neselektīvā barotnē; abas efektivitātes mērītas vienai un tai pašai kultūrai selekcijas brīdī.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Cloning efficiency of mutant colonies in selective medium}}{\text{Cloning efficiency in non} - \text{selective medium}}$$

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto plates:

CE = koloniju skaits / uz plates uzsēto šūnu skaits

Ja klonēšanās efektivitātes noteikšanai izmanto mikroiedobju plates:

Koloniju skaitu uz vienu mikroiedobju plates iedobi raksturo ar Puasona sadalījumu.

klonēšanās efektivitāte = -LnP(0) / vienā iedobē uzsēto šūnu skaits

-LnP(0) ir varbūtīgais tukšo iedobju skaits no apsēto iedobju skaita, un to apraksta ar formulu

LnP(0)= -Ln (tukšo iedobju skaits / apsēto iedobju skaits);

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **ZĪDĪTĀJU ŠŪNU TRANSFORMĀCIJA *IN VITRO***

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. METODES BŪTĪBA

Zīdītāju šūnu kultūras *in vitro* var izmantot ķīmiski inducētu fenotipisko izmaiņu noteikšanai, kuras saista ar ļaundabīgu transformāciju *in vivo*. Šim nolūkam plaši izmanto tādas šūnas kā CH310T ½, SHE, Fišera žurku šūnas, pētot izmaiņas šūnu morfoloģijā, transformācijas perēkļu veidošanos vai spēju vairoties mīkstajā agarā. Retāk izmanto tādas sistēmas, kas ļauj reģistrēt citas fizioloģiskas vai morfoloģiskas izmaiņas pēc ķīmisku kancerogēnu iedarbības. Nevienam *in vitro* pētāmajam parametram nav pierādīta cēloniska sakarība ar vēzi. Dažas eksperimentālās sistēmas var izmantot audzēju promotoru noteikšanai. Par citotoksicitāti var spriest pēc pārbaudāmās vielas ietekmes uz koloniju veidošanos (klonēšanas efektivitāti) šūnu kultūrās vai to vairošanās ātrumu. Citotoksicitātes mērījumi ļauj secināt, ka pārbaudāmās vielas iedarbība ir toksikoloģiski determinēta, taču to nevar visos gadījumos izmantot transformācijas biežuma aprēķināšanai, jo tas dažreiz paredz ilgāku inkubāciju un/vai šūnu atkārtotu izsēšanu.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

Sagatavošanas darbi

Šūnas

Atkarībā no transformācijas noteikšanas metodes var izmantot dažādas šūnu līnijas vai primārās šūnu kultūras. Jāpārliecinās, ka izmēģinājumā izmantotās šūnas ļauj novērot noteiktas fenotipiskās izmaiņas pēc zināmu kancerogēnu iedarbības un ka laboratorijā izmantotā metode ir dokumentāri pierādīta par derīgu un uzticamu.

Barotne

Jāizmanto tādas barotnes un izmēģinājuma apstākļi, kas ir saderīgi ar transformācijas noteikšanas metodi.

▼B

Pārbaudāmā viela

Pārbaudāmās vielas pirms šūnu apstrādes var pievienot barotnei vai izšķīdināt/suspendēt piemērotā šķīdinātājā/nesējvielā. Šķīdinātājs/nesējviela galīgajā koncentrācijā nedrīkst nomākt šūnu dzīvotspēju, vairošanās ātrumu vai transformācijas biežumu.

Metaboliskā aktivācija

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai gan kopā ar piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Turpretī, ja izmanto šūnu tipus, kam piemīt iekšējā metaboliskā aktivitāte, šīs metaboliskās sistēmas aktivitātei un īpašībām jābūt saderīgām ar pārbaudāmās ķīmiskās vielas klasi.

Testa apstākļi

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Katrā eksperimentā jāparedz pozitīvā kontrole, gan izmantojot savienojumu, kam nav vajadzīga iepriekšējā metaboliskā aktivācija, gan tādu, kam tā ir vajadzīga; tāpat jāizmanto negatīvā kontrole (ar šķīdinātāju/nesējvielu).

Šeit ir minētas vielas, kuras var izmantot kā pozitīvo kontroli:

— vielas, kurām nav vajadzīga aktivācija:

  — etilmetānsulfonāts,

  — β-propiolaktons,

— savienojumi, kam ir vajadzīga metaboliskā aktivācija:

  — 2-acetilaminofluorēns,

  — 4-dimetilaminoazobenzols,

  — 7,12-dimetilbenzantracēns.

Ja iespējams, kā papildu pozitīvā kontrole jāizmanto viela no tās pašas ķīmiskās klases, pie kuras pieder pārbaudāmā viela.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmā viela jāizmanto vairāku koncentrāciju diapazonā. Vielai šajā koncentrāciju diapazonā jāuzrāda toksicitāte, kas ir atkarīga no koncentrācijas, turklāt lielākās koncentrācijas ietekmē šūnu izdzīvošanai jābūt zemai, bet mazākās koncentrācijas ietekmē tai jābūt apmēram tādai pašai kā negatīvajā kontrolē. Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdenī, lielāko pārbaudāmo koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

▼B

Testa norise

Vajadzīgajā laika sprīdī, kas atkarīgs no izmantotās eksperimentālās sistēmas, šūnas pakļauj vielas iedarbībai un, ja izmanto garāku ekspozīcijas laiku, vielu var ievadīt atkārtoti, vienlaikus apmainot barotni (un vajadzības gadījumā arī metaboliskās aktivācijas sistēmu). Šūnām, kuru iekšējā metaboliskā aktivitāte nav pietiekami augsta, pārbaudāmo vielu pievieno gan kopā ar nepieciešamo metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Beidzoties ekspozīcijas laikam, šūnas skalo, lai atbrīvotos no pārbaudāmās vielas, un, ievērojot apstākļus, kas ļauj izpausties transformēto šūnu fenotipam, kultivē tālāk, reģistrējot transformācijas biežumu. Visi iegūtie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā eksperimentā.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā atkarībā no izmantotās metodes, piemēram, norādot plašu skaitu, plates, kurās novērota transformācija, vai transformēto šūnu skaitu. Vajadzības gadījumā izdzīvojušo šūnu skaitu norāda procentos no attiecīgā skaita kontroles kultūrās un transformācijas biežumu aprēķina kā transformēto šūnu skaitu attiecībā pret izdzīvojušo šūnu skaitu. Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotais šūnu tips, šūnu kultūru skaits, šūnu kultivēšanas paņēmieni,

— testa apstākļi (pārbaudāmās vielas koncentrācija, izmantotais šķīdinātājs/nesējviela, inkubācijas ilgums, ekspozīcijas ilgums un biežums, šūnu slāņa blīvums apstrādes laikā, izmantotās eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas tips, pozitīvā un negatīvā kontrole, kontrolējamā fenotipa raksturojums, selektīvā sistēma (ja izmanto), izvēlēto devu pamatojums),

— izmantotā dzīvotspējīgu un transformētu šūnu uzskaites metode,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

▼M8

B.22. **GRAUZĒJU DOMINANTO LETĀLO MUTĀCIJU TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 478 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šī modificētā testēšanas metodes versija atspoguļo vairāk nekā trīsdesmit gadu pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar tādiem citiem toksiskuma testiem kā pētījumi par ontoģenētisko un reproduktīvo toksicitāti vai genotoksicitāti; tomēr šā testa ierobežojumu dēļ, kā arī tādēļ, ka tajā izmanto daudz dzīvnieku, to paredzēts izmantot nevis par primāru metodi, bet gan par papildu testēšanas metodi, kuru var izmantot tad, ja regulatīvās prasības neatstāj citu alternatīvu. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlietoto dzīvnieku skaitu. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par jaunākajiem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Dominanto letālo mutāciju (*DL*) testa nolūks ir izpētīt, vai ķimikālijas neizraisa mutācijas, kuru cēlonis ir hromosomu aberācijas dīgļšūnās. Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka, lai gan dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi var atšķirties, šie faktori tomēr ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. *DL* mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķimikālijai, liecina, ka ķimikālija skārusi dīgļaudus.

3. *DL* mutācijas izraisa embrija vai augļa nāvi. *DL* mutācijas inducēšanās pēc tam, kad testa dzīvnieks eksponēts testējamai ķimikālijai, liecina, ka ķimikālija skārusi dīgļšūnas.

4. *DL* tests ir relevants beigupunkts cilvēka apdraudējuma un pa dīgļlīniju nodotu ģenētisku slimību riska prognozēšanā un noder tam, lai ar somatisku *in vivo* beigupunktu palīdzību apstiprinātu pozitīvus testu rezultātus. Tomēr šim testam vajag daudz dzīvnieku un tas ir darbietilpīgs; tāpēc tā veikšana ir ļoti dārga un patērē daudz laika. Tā kā dominantu letālu mutāciju spontānais biežums ir diezgan augsts, šā testa jutīgums nelielu mutāciju biežuma palielinājumu detektēšanā parasti ir ierobežots.

5. Galveno terminu definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Šo testu visbiežāk izdara ar pelēm (2) (3) (4), taču dažos gadījumos, ja tas zinātniski pamatoti, var būt lietderīgi izmantot tādas citas sugas kā žurka (5) (6) (7) (8). Parasti *DL* ir lielu hromosomālu aberāciju (strukturālu un skaitlisku anomāliju) rezultāts (9) (10) (11), taču nevar izslēgt gēnu mutācijas.

▼M8

DL mutācija ir tāda tieši dīgļšūnā radusies vai agrīnā embrijā pēc apaugļošanas konstatēta mutācija, kura neizraisa gametas disfunkciju, bet ir apaugļotajai olšūnai vai augošajam embrijam letāla.

7. Atsevišķus tēviņus attiecīgos intervālos secīgi pāro ar iepriekš nepārotām mātītēm. Pēc apstrādes notikušo pārošanās reižu skaits ir atkarīgs no *DL* pētījuma galanolūka (23. punkts), un tam jābūt tādam, lai būtu drošība, ka attiecībā uz *DL* ir izvērtētas visas vīrišķo dīgļšūnu nobriešanas fāzes (12).

8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķimikālija vai tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūs, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTA PRINCIPS

9. Parasti tēviņus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pāro ar neapstrādātām iepriekš nepārotām mātītēm. Izmantojot secīgus pārošanas intervālus, var testēt dažādu tipu dīgļšūnas. Kad pēc pārošanas pagājis attiecīgs laiks, mātītes eitanazē un tām izpēta dzemdi, lai noteiktu implantējušos augļu un nedzīvo un dzīvo embriju skaitu. Testējamas ķimikālijas dominanto letalitāti nosaka, dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti apstrādātajā grupā salīdzinot ar dzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā. Pārsvars, kāds nedzīvo implantējušos augļu skaitam uz vienu mātīti apstrādātajā grupā ir pār nedzīvo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti kontrolgrupā, atspoguļo testējamās ķimikālijas inducēto pēcimplantācijas zudumu. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā. Pirmsimplantācijas zudumu var aplēst, salīdzinot, kāds apstrādātajā grupā un kontrolgrupā ir dzelteno ķermeņu skaits mīnus implantējušos augļu kopskaits vai arī implantējušos augļu kopskaits uz vienu mātīti.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Kompetence šā testa veikšanā jāpierāda, demonstrējot spēju reproducēt dominanto letālo mutāciju biežumu no publicētiem datiem (piem., (13) (14) (15) (16) (17) (18)) ar tādām pozitīvo kontroļu vielām (arī ja atbildreakcijas ir vājas) kā 1. tabulas sarakstā norādītās un ar nesēju kontrolēm un iegūstot negatīvo kontroļu biežumus, kas atbilst pieņemamam datu diapazonam 1 (sk. atsauces augstāk) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds pieejams.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli dzimumnobrieduši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peles, bet var būt lietderīgi izmantot arī žurkas. Var izmantot arī jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus, ja vien pārskatā tas tiek zinātniski pamatots.

▼M8

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Relatīvajam mitrumam ideālā gadījumā jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Pirms apstrādes vai pārošanas, ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un ar attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselus un dzimumnobriedušus pieaugušus tēviņus un mātītes nejaušināti sadala kontrolgrupās un apstrādes grupās. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nedrīkst pieļaut pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas šķērskontaminēšanos. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms devu došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķimikālijas atkarībā no to fizikālķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un nav noteikti pareizi glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa nosacījumi

Šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un nedrīkst būt aizdomas, ka tas spēj reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Ieteicams vienmēr, kad vien iespējams, vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Tomēr pozitīvās kontroles dzīvnieki nav jāapstrādā tādā pašā apstrādes ceļā kā dzīvnieki,

▼M8

kas saņem testējamo ķimikāliju; nav arī jāņem paraugi no visiem pārošanas intervāliem. Pozitīvās kontroles vielām jābūt tādām, par kurām zināms, ka testam izmantotajos apstākļos tās rada *DL*. Izņemot apstrādi, ar kontrolgrupu dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

17. Pozitīvās kontroles vielu devas jāizraugās tā, lai tās konsekventi radītu pozitīvu ietekmi, kura izpaužas kā dominantas letālas mutācijas, taču lai šī ietekme būtu vāja vai vidēja, tādējādi paverot iespēju kritiski izvērtēt testa veiktspēju un jutīgumu. Pozitīvās kontroles vielu un attiecīgu devu piemēri sniegti 1. tabulā.

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu piemēri

Viela [*CAS* Nr.] (atsauces Nr.)	Iedarbīgo devu diapazons (mg/kg) (grauzēju suga)	Devu došanas laiks (dienas)
Trietilēnmelamīns [51-18-3] (15)	0,25 (pelēm)	1
Ciklofosfamīds [50-18-0] (19)	50–150 (pelēm)	5
Ciklofosfamīds [50-18-0] (5)	25–100 (žurkām)	1
Etilmetānsulfonāts [62-50-0] (13)	100–300 (pelēm)	5
Monomērakrilamīds [79-06-1] (17)	50 (pelēm)	5
Hlorambucils [305-03-3] (14)	25 (pelēm)	1

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas (20). Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina *DL* vai citu kaitīgu iedarbību, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Atsevišķus tēviņus attiecīgos iepriekš noteiktos intervālos (piem., ar nedēļas intervālu, 21. un 23. punkts) secīgi pāro ar, vēlams, vienu atsevišķu iepriekš nepārotu mātīti. Tēviņu skaits grupā būtu iepriekš jānosaka tā, lai ar to pietiktu (kombinācijā ar katrā pārošanas intervālā pāroto mātīšu skaitu) tādas statistiskas jaudas iegūšanai, kāda vajadzīga, lai detektētu, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (44. punkts).

20. Ar statistiskās jaudas aprēķiniem būtu iepriekš jānosaka, ar kādu mātīšu skaitu uz vienu pārošanas intervālu būs iespējams detektēt, ka *DL* biežums vismaz dubultojas (proti, tikdaudz grūsnu mātīšu, lai būtu iegūti vismaz 400 implantējušies augļi) (20) (21) (22) (23) un lai būtu gaidāms vismaz viens nedzīvs implantējies auglis uz analizējamo vienību (t.i. vienai devai atbilstošo pārošanas grupu) (24).

▼M8

Devu došanas periods un pārošanas intervāli

21. Pārošanas intervālu skaits pēc apstrādes ir atkarīgs no apstrādes grafika un ar to būtu jānodrošina, ka attiecībā uz *DL* inducēšanos jāizvērtē visas vīrišķo dīgļšūnu nobriešanas fāzes (12) (25). Kas attiecas uz vienu apstrādi, proti, līdz piecām devu došanas reizēm dienā, ir ieteicams, lai pēc pēdējās apstrādes ar nedēļu ilgiem intervāliem notiktu 8 (peļu) vai 10 (žurku) pārošanās. Ja devu došanas reizes ir vairākas, proporcionāli devu došanas perioda paildzināšanai var samazināt pārošanas intervālu skaitu, taču saglabājot mērķi izvērtēt visas spermatoģenēzes fāzes (piem., ja eksponēšana ilgusi 28 dienas, peļu gadījumā visu spermatoģenēzes fāžu izvērtēšanai pietiek tikai ar 4 pārošanas reizēm nedēļā). Visi apstrādes un pārošanas grafiki būtu zinātniski jāpamato.

22. Mātītes būtu jāatstāj kopā ar tēviņiem vismaz vienu estrālo ciklu (piem., gan pelēm, gan žurkām vienu estrālo ciklu aptver viena nedēļa). Mātītes, kas kādā nedēļu ilgā intervālā nav pārojušās, var izmantot vēlākam pārošanas intervālam. Tās var arī atstāt, līdz pārošanās notikusi, par ko liecina sperma vagīnā vai vaginmāla korķa esība.

23. Izmantotā ekspozīcija un pārošanas režīms ir atkarīgi no *DL* pētījuma galanolūka. Ja mērķis ir noteikt, vai kāda konkrēta ķimikālija pati par sevi inducē *DL* mutācijas, atzīts paņēmiens ir eksponēt dzīvniekus visā spermatoģenēzes ciklā (piem., pelei 7 nedēļas, 5–7 apstrādes nedēļā) un pārot tos vienreiz tā noslēgumā. Tomēr, ja mērķis ir apzināt pret *DL* inducēšanos jutīgo dīgļšūnu tipu, priekšroka dodama vienreizējai vai piecas dienas ilgai ekspozīcijai, kam seko pārošana reizi nedēļā.

Devu līmeņi

24. Iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, kas jāizdara tāpēc, ka nav devas izvēlei piemērotu datu, jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantoti galvenajā testā (26). Pētījuma mērķim jābūt noskaidrot maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir lielākā pieļaujamā deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā ir panesama bez pētījumu ierobežojošu toksiskuma pazīmju izraisīšanas (piem., inducē anormālu izturēšanos vai reakcijas, nelielu ķermeņa masas samazināšanos vai citotoksicitāti hematopoētiskajā sistēmā, bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu humāni jāizdara eitanāzija (27)).

25. MTD arī nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt pārošanās rezultativitāti (21).

26. Testējamās ķimikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķimikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.

27. Lai iegūtu informāciju par devas–atbildreakcijas sakarību, pilnīgā pētījumā jāiekļauj negatīva kontrolgrupa un vismaz trīs devu līmeņi, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja testējamai ķimikālijai diapazona noteikšanas pētījumā toksiskums neizpaužas vai ķimikālijas toksiskums neizpaužas uz esošo datu pamata, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķimikālijai toksiskums tomēr izpaužas,

▼M8

MTD jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Attiecībā uz netoksiskām ķimikālijām robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 1 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

Devu došana

28. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Kā pamatotus var izraudzīties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, vietēju aplikāciju, ieelpošanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu) vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā būtu jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzirdināmam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un pārošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 31. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

29. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Devas došanas periodā visus dzīvniekus vismaz divreiz dienā novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Visi dzīvnieki jānosver pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos pēc tam vismaz reizi nedēļā, kā arī eitanazēšanas brīdī. Vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieks toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (27).

Audu ievākšana un pārstrāde

30. Mātītes eitanazē otrajā grūtniecības pusē 13. grūsnības dienā (GD) pelēm un 14.–15. GD žurkām. Izmeklē dzemdi attiecībā uz dominantām letālām ietekmēm, nosakot implantējušos augļu skaitu, dzīvo un mirušo embriju skaitu un dzelteno ķermeņu skaitu.

31. Lai saskaitītu dzeltenos ķermeņus, atsedz dzemdes ragus un olnīcas; izņem, skaita un nosver augļus. Jāraugās, lai tiktu pamanītas rezorbcijas, ko var aizsegt dzīvi augļi; visas rezorbcijas jāuzskaita. Dokumentē augļu mirstību. Dokumentē arī veiksmīgi apaugļojušos mātīšu skaitu, kopējo implantāciju un pirmsimplantācijas zudumu skaitu, kā arī pēcimplantācijas mirstību (ieskaitot

▼M8

agrīnas un vēlīnas rezorbcijas gadījumus). Turklāt redzamos augļus var vismaz 2 nedēļas saglabāt Buina fiksācijas šķīdumā, fiksējot lielas ārējas kroplības (28) un tādējādi gūstot papildinformāciju par testējamā līdzekļa reproduktīvo un ontoģenētisko ietekmi.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

32. Dati jāapkopo tabulā, norādot pāroto tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, kā arī to mātīšu skaitu, kurām nav iestājusies grūtniecība. Katras pārošanās rezultāti līdz ar katra tēviņa un mātītes identitāti jāatspoguļo atsevišķi. Attiecībā uz katru mātīti jāreģistrē pārošanas intervāls, apstrādāto tēviņu devu līmenis un dzīvo un nedzīvo implantējušos augļu skaits.

33. Pēcimplantācijas zudumu aprēķina, nosakot nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu apstrādātajā grupā un to salīdzinot ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret augļu kopskaitu nesēja/šķīdinātāja kontrolgrupā.

34. Pirmsimplantācijas zudumu var aprēķināt pēc dzelteno ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpības vai pēc implantējušos augļu vidējā skaita samazinājuma vienā dzemdē salīdzinājumā ar kontroles dzīvnieku pārošanās rezultātiem. Ja aplēš pirmsimplantācijas zudumu, tas jānorāda ziņojumā.

35. Dominanto letālo koeficientu aplēš šādi: (nāves gadījumi pēc implantācijas / kopējās implantācijas uz vienu mātīti) × 100.

36. Pārskatā jāatspoguļo 29. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

— paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām vēsturisko negatīvo kontroļu datu normām un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem, ja tādi ir (sk. 10. un 18. punktu);

— paralēlās pozitīvās kontroles inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);

— ir izanalizēts pietiekams kopējo implantējušos augļu un devu skaits (20. punkts);

— maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 24. un 27. punktā aprakstītajiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

38. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.

▼**M8**

39. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

— vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— attiecībā uz vismaz vienu no eksperimenta nosacījumiem (piem., pārošanas intervāls viena nedēļa) palielinājums, to attiecīgā testā izvērtējot, ir saistīts ar devu un

— kāds no iegūtajiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai ārpus laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tāds pieejams.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku dīgļšūnās spēj inducēt dominantas letālas mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm sniegti 44. punktā, citas ieteicamas statistiskas pieejas var atrast arī literatūrā (20) (21) (22) (24) (29). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un

— visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku dīgļšūnās nespēj inducēt dominantas letālas mutācijas.

41. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.

42. Ja atbildreakcija nav viennozīmīgi negatīva vai viennozīmīgi pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu spriedumus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., spriež, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (30).

43. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.

44. Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību ieteicams uzskatīt tēviņu. Lai gan skaitīšanas datu (piem., implantējušos augļu skaits uz vienu mātīti) sadalījums var būt pēc Puasona, un/vai īpatsvara (piem., nedzīvo implantējušos augļu procentuālās daļas) sadalījums var būt binomiāls, tomēr bieži gadās, ka šādiem datiem ir palielināta dispersija (31). Tātad statistiskajā analīzē vispirms, izmantojot tādus dispersijas testus kā Kokrana binomiālās mainības tests (32) vai Tarona C(α) tests binomiālās palielinātās dispersijas noteikšanai, vajadzētu testēt, vai dispersija nav palielināta / nepietiekama(31) (33). Ja nekonstatē novirzi no binomiālā sadalījuma, pa devu līmeņiem proporcionālas tendences var testēt ar Kokrana–Ārmitidža tendenčtestu (34), savukārt pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — ar Fišera precīzo testu (35). Līdzīgi, nekonstatējot novirzi no Puasona sadalījuma,

▼M8

var ar Puasona regresijas metodi (36) testēt skaitījuma tendences, bet pārveida salīdzinājumus ar kontrolgrupu — Puasona modeļa kontekstā, izmantojot pāru kontrastus (36). Ja konstatē būtiski palielinātu vai pazemināt dispersiju, ieteicams izmantot neparametriskas metodes (23) (31). Pie tām pieder tādi ranžējoši testi kā Džonkhīra–Terpstras tendenčtests (37) un Manna–Vitnija testi (38) pārveida salīdzinājumiem ar nesēja/šķīdinātāja kontroles grupu, kā arī permutāciju testi, atkārtotu paraugošanu testi vai *bootstrap* testi tendenču konstatēšanai un pārveida salīdzinājumiem ar kontrolgrupu (31) (39).

45. Pozitīvi *DL* testa rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija devu saņēmuša testētās sugas tēviņa dīgļšūnām ir genotoksiska.

46. Apsverot, vai novērotās vērtības ir vēsturiskā kontroles diapazona robežās vai ārpus tām, var iegūt pieturas punktus atbildreakcijas bioloģiskā nozīmīguma izvērtēšanai (40).

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izraudzīšanās pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

▼**M8**

— barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;

— preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija un izraudzīšanās pamatojums;

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;

— īslaicīgiem pētījumiem: tēviņu individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;

— devu diapazona noteikšanas pētījuma dati;

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu;

— ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;

— metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;

— ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;

— faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;

— detalizēta informācija par krātiņa vides bagātinājumu;

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;

— atsāpināšanas metode;

— eitanāzijas metode;

▼**M8**

— audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras;

— visu komplektu un reaģentu avots un sērijas numuri (attiecīgā gadījumā);

— *DL* skaitīšanas metodes;

— pārošanas grafiks;

— pārošanas veiksmīguma noteikšanas metode;

— eitanazēšanas laiks;

— *DL* ietekmju novērtējuma atzīmju kritēriji, ieskaitot dzelteno ķermeni, implantācijas gadījumus, rezorpcijas gadījumus un pirmsimplantācijas zudumus, dzīvos implantējušos augļus, nedzīvos implantējušos augļus.

Rezultāti:

— dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;

— tēviņu ķermeņa masa devu došanas un pārošanas periodos;

— pāroto mātīšu skaits;

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;

— tagadējie un vēsturiskie negatīvas kontroles dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām un standartnovirzēm;

— tagadējie pozitīvās kontroles dati;

— tabulā apkopoti dati par katru mātīti, arī: dzelteno ķermeņu skaits katrai mātītei; implantāciju skaits katrai mātītei; resorpcijas gadījumu un pirmsimplantēšanās bojāejas gadījumu skaits katrai mātītei; dzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; nedzīvo implantējušos augļu skaits katrai mātītei; augļu svars;

— augstāk minēto datu summa par katru pārošanas periodu un devu, norādot dominanto letālo mutāciju biežumu;

— izmantotā statistiskā analīze un metodes.

Rezultātu iztirzājums

Secinājums.

LITERATŪRA

(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) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., 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., and 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. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and 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. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and 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. and 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., and 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, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and 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. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. 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. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. 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. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 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. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. 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. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. 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 and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Dzeltenais ķermenis: hormonus izdalošs veidojums, kas olnīcā izveidojies olšūnas pamesta folikula vietā. Dzelteno ķermeņu skaits olnīcās atbilst ovulējušo olšūnu skaitam.

Dominanta letāla mutācija: mutācija, kas notiek dīgļšūnā vai nostiprinās pēc apaugļošanās un izraisa embrija vai augļa nāvi.

Auglības koeficients: pāroto grūsno mātīšu skaits uz visu pāroto mātīšu skaitu.

Pārošanas intervāls: laiks starp ekspozīcijas beigām un apstrādātu tēviņu pārošanu. Kontrolējot šo intervālu, iespējams izvērtēt ķimikāliju ietekmi uz dažādu tipu dīgļšūnām. Pelēm, kuras pāro 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. un 8. nedēļā pēc ekspozīcijas beigām, tiek mērīta ietekme uz spermu, kondensētajiem spermatīdiem, apaļajiem spermatīdiem, pahitēnas spermatocītiem, agrīnajiem spermatocītiem, spermatogonijiem, kas diferencējušies, spermatogonijiem, kas diferencējas, un dīgļšūnu spermatogonijiem.

Pirmsimplantācijas zudums: dzelteno ķermeņu un implantējušos augļu skaita starpība. To var aplēst, arī salīdzinot kopējo implantējušos augļu skaitu uz vienu mātīti devu grupās un kontroles grupās.

Pēcimplantācijas zudums: nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecība apstrādātajā grupā salīdzinājumā ar nedzīvo implantējušos augļu skaita attiecību pret implantējušos augļu kopskaitu kontrolgrupā.

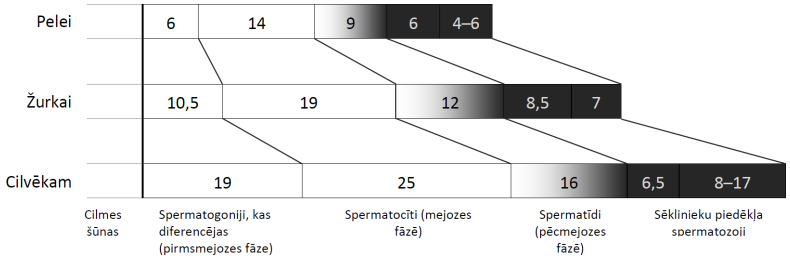
Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

▼**M8**

2. papildinājums

ZĪDĪTĀJU SPERMATOGENĒZES LAIKI



1. attēls: Peļu, žurku un cilvēka vīrišķo dīgļšūnu attīstības ilguma (dienās) salīdzinājums. Ar ēnojumu iezīmētajos periodos nenotiek DNS reparācija.

Augstāk sniegts peļu, žurku un cilvēka spermatogenēzes shematisks attēls (avots *Adler*, 1996). Pie spermatogonijiem, kas diferencējušies, pieder: A atsevišķie; A sapārotie; A sarindotie spermatogoniji (*Hess and de Franca*, 2008). Par īstajām cilmes šūnām uzskata A atsevišķos spermatogonijus; tāpēc, lai novērtētu ietekmi uz cilmes šūnām, no testējamās ķimikālijas pēdējās injekcijas līdz pārošanai jāpaiet vismaz 49 dienām.

ATSAUCES

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

B.23. ZĪDĪTĀJU SPERMATOGONIJU HROMOSOMU ABERĀCIJU TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 483 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, mainīgo regulatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Šis modificētais testēšanas metodes variants atspoguļo ilggadēju pieredzi šā testa veikšanā un šā testa potenciālu tikt integrētam vai kombinētam ar citiem toksiskuma vai genotoksicitātes pētījumiem. Ja toksiskumu testē kombinēti, iespējams būtiski samazināt testos izlietoto dzīvnieku skaitu. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO genotoksicitātes testēšanas vadlīnijas grozījumiem (1).

2. Zīdītāju spermatogoniju hromosomu aberāciju *in vivo* testā nosaka vielas, kas zīdītāju spermatogonijos rada strukturālas hromosomu aberācijas (1) (2) (3) (4) (5). Dominanto letālo mutāciju tests genotoksicitātes novērtēšanai ir relevants arī tāpēc, ka dažādām sugām *in vivo* metabolisms, farmakokinētika un DNS reparācijas procesi gan var atšķirties, tomēr šie faktori ir aktīvi un piedalās atbildreakcijā. Šī testēšanas metode nav izstrādāta skaitlisku anomāliju mērīšanai; šo testu tam parasti neizmanto.

3. Šis tests mēra strukturālas hromosomu aberācijas (gan hromosomtipa, gan hromatīdtipa) spermatogoniju dīgļšūnu dalīšanās procesā un tātad gaidāms, ka tas spēj prognozēt pārmantojamu mutāciju inducēšanos šajās dīgļšūnās.

4. Galveno terminu definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šajā testā parasti izmanto grauzējus, bet dažos gadījumos ir lietderīgi izmantot citas sugas, ja tas ir zinātniski pamatoti. Grauzēju sēklinieku citoģenētiskos standartpreparātos tiek ģenerēta mitotiska (spermatogoniji) un mejotiska (spermatocīti) metafāze. Balstoties uz hromosomu morfoloģiju, identificē mitotisko un mejotisko metafāzi (4). Šis citoģenētiskais i*n vivo* tests detektē strukturālas hromosomu aberācijas spermatogoniju mitozē. Šai metodei nav citu mērķšūnu.

6. Lai spermatogoniju šūnās varētu detektēt hromatīdtipa aberācijas, pirms nākamajās šūnu dalīšanās reizēs šīs aberācijas pārvēršas par hromosomtipa aberācijām, jāizpēta pirmā mitotiskā šūnu dalīšanās pēc apstrādes. Papildu informāciju par apstrādātiem spermatocītiem var iegūt, diakinēzes I metafāzē un II metafāzē attiecībā uz strukturālām aberācijām analizējot mejotiskas hromosomas.

▼**M8**

7. Sēkliniekos atrodas vairāku paaudžu spermatogoniji (5), un šo dažādo tipu dīgļšūnām jutība pret apstrādi ar kādu ķimikāliju var izpausties individuālā diapazonā. Tātad detektētās aberācijas ir apstrādāto spermatogoniju šūnu populāciju agregēta atbildreakcija. Sēklinieku preparātos lielākā daļa mitotisko šūnu ir B spermatogoniji, kuriem šūnas cikls ir apmēram 26 h (3).

8. Ja ir pierādījumi, ka testējamā ķimikālija, tās metabolīts vai metabolīti sēkliniekos nenokļūs, šo testu izmantot nav lietderīgi.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

9. Dzīvniekus attiecīgā ekspozīcijas ceļā eksponē testējamai ķimikālijai un pēc apstrādes pienācīgā laikā eitanazē. Pirms eitanāzijas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piem., kolhicīnu vai *Colcemid*®)). Tad no dzimumšūnām pagatavo hromosomu preparātus, ko iekrāso, un nosaka hromosomu aberācijas metafāzes šūnām.

LABORATORIJAS KOMPETENCES VERIFICĒŠANA

10. Šā testa izpildes kompetence būtu jāapliecina, pierādot spēju ar 1. tabulā norādītajām pozitīvajām kontrolvielām (arī ar tādām, uz kurām ir vāja atbildreakcija) reproducēt gaidāmo spermatogoniju strukturālo hromosomu aberāciju biežumu un iegūt tādu negatīvo kontroļu biežumu, kas atbilst pieņemtajam kontroldatu diapazonam publicētajā literatūrā (piem., (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) vai laboratorijas vēsturisko kontroļu sadalījumam, ja tāds ir.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

11. Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu dzīvnieki. Parasti izmanto peļu tēviņus; tomēr var izmantot citu attiecīgu zīdītāju sugu tēviņus, ja tas zinātniski pamatoti un lai būtu iespējams šā testa izpildi apvienot ar citu testēšanas metodi. Ja grauzēju vietā izmanto citas sugas, to izmantošana pārskatā zinātniski jāpamato.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

12. Attiecībā uz grauzējiem telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 %, bet katrā ziņā vismaz 40 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas uzturu ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Ja netiek gaidīts vai novērots, ka grauzēji izturēsies agresīvi, tos ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās (ne vairāk kā pa pieci), vēlams, būros ar cietu grīdu un attiecīgi bagātinātu vidi. Ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

▼M8

Dzīvnieku sagatavošana

13. Veselīgus jaunus pieaugušus tēviņus (devu došanas sākumā 8–12 nedēļas vecus) nejaušināti iedala kontroles grupās un grupās, kas saņem devas. Katru dzīvnieku unikālā veidā identificē, izmantojot humānu, minimāli invazīvu metodi (piem., apgredzenojot, izmantojot krotālijas, ievietojot mikroshēmu vai izmantojot biometrisko identificēšanu, bet ne apgriežot ausis vai pirkstus) un vismaz piecas dienas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Nav pieļaujama pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas šķērskontaminēšanās. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas individuālajām atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ±20 %.

Devu sagatavošana

14. Pirms dzīvniekiem dod devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē attiecīgos šķīdinātājos vai nesējos vai jāpievieno uzturam vai dzirdināmajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms devas došanas atšķaidīt. Inhalatīvas ekspozīcijas vajadzībām testējamās ķimikālijas atkarībā no fizikālķīmiskajām īpašībām var būt gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un ja vien no tiem neizriet pareizie glabāšanas nosacījumi, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testa apstākļi — šķīdinātājs/nesējs

15. Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Citu, mazāk izplatītu šķīdinātāju vai nesēju izmantošana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību. Kad vien iespējams, vispirms ieteicams izmantot šķīdinātājus vai nesējus uz ūdens bāzes. Plaši izmantoti saderīgi šķīdinātāji/nesēji ir, piem., ūdens, fizioloģiskais šķīdums, metilcelulozes šķīdums, karboksimetilcelulozes nātrija sāls šķīdums, olīveļļa un kukurūzas eļļa. Ja nav pieejami vēsturiski vai publicēti kontroļu dati, kas apliecinātu, ka izvēlētais atipiskais šķīdinātājs/nesējs neinducē strukturālas hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, jāveic sākotnējs pētījums, lai noteiktu šķīdinātāja/nesēja kontroles pieņemamību.

Pozitīvās kontroles

16. Būtu vienmēr jāizmanto paralēlas pozitīvas kontroles dzīvnieki, ja vien laboratorija nav apliecinājusi kompetenci testa veikšanā un vēl nesen (piem., pēdējo piecu gadu laikā) testu izmantojusi regulāri. Ja nav paralēlas pozitīvas kontrolgrupas, katrā eksperimentā jāparedz novērtēšanas kontroles (fiksēti un neiekrāsoti priekšmetstikliņi). To var panākt, pētījumā ar atzīmēm novērtējot arī attiecīgus etalonparaugus, kas saglabāti pēc iegūšanas kādā atsevišķā pozitīvās kontroles eksperimentā, ko testējošā laboratorija izdara regulāri (piem., ik 6–18 mēnešus), piem., kompetences testēšanā un pēc tam regulāri pēc vajadzības.

17. Pozitīvās kontroles vielām stabili jārada detektējams tādu šūnu biežuma pieaugums, kurās strukturālās hromosomu aberācijas pārsniedz spontāno līmeni. Pozitīvās kontroles devas izvēlas tā, lai to ietekme būtu skaidri redzama, tomēr vērtētājam nebūtu uzreiz redzama kodēto paraugu identitāte. Pozitīvās kontroles vielu piemēri norādīti 1. tabulā.

▼**M8**

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu piemēri

Vielas [*CAS* Nr.] (atsauces Nr.)
Ciklofosfamīds (monohidrāts) [*CAS* Nr. 50-18-0 (*CAS* Nr. 6055-19-2)] (9)
Streptonigrīns [*CAS* Nr. 108-91-8] (7)
Mitomicīns C [*CAS* Nr. 50-07-7] (6)
Monomērakrilamīds [*CAS* Nr. 79-06-1] (10)
Trietilēnmelamīns [*CAS* Nr. 51-18-3] (8)

Negatīvās kontroles

18. Katrā paraugošanas reizē jābūt arī negatīvās kontroles dzīvniekiem, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet pārējās darbības izdara tāpat kā ar grupām, kam dotas devas. Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītais šķīdinātājs/nesējs neierosina hromosomu aberācijas un tam nav citādas kaitīgas ietekmes, katrā paraugošanas reizē jābūt arī neapstrādātiem kontroldzīvniekiem, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesēju izmantot par kontrolvielu.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits

19. Pētījuma sākumā būtu jānosaka grupu lielums tā, lai katrā grupā būtu vismaz 5 tēviņi. Šādu dzīvnieku skaitu uzskata par pietiekamu adekvātas statistiskās jaudas nodrošināšanai (proti, lai parasti būtu iespējams ar 80 % varbūtību nozīmīguma līmenī 0,05 detektēt vismaz hromosomu aberāciju biežuma dubultošanos pie negatīvās kontroles līmeņa 1 % vai augstāka.) (3) (11). Orientējošs piemērs parastām prasībām attiecībā uz dzīvnieku maksimālo skaitu: pētījumā ar divām paraugošanas reizēm izmanto trīs devu grupas un paralēlu negatīvo kontrolgrupu, kā arī pozitīvo kontrolgrupu (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā); būtu nepieciešami 45 dzīvnieki.

Devu došanas grafiks

20. Testējamo ķimikāliju parasti dod vienreiz (proti, kā vienreizēju devu); var izmantot citus devu režīmus, ja vien tie ir zinātniski pamatoti.

21. No grupas, kurā pārbauda lielāko devu, paraugus pēc devas došanas ņem divās paraugošanas reizēs. Tā kā testējamās(-o) ķimikālijas(-u) uzņemšanai un metabolizēšanai, kā arī tās iedarbībai uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgais laiks var ietekmēt hromosomu aberāciju noteikšanas optimālo laiku, ieteicama viena agrīna un viena vēla paraugošanas reize apmēram 24 un 28 stundas pēc devas došanas. Izņemot lielāko devu, paraugošanu ieteicams izdarīt agri, 24 stundas (par B spermatogonija šūnas cikla laiku īsāks vai ar to vienāds laiks, tāpēc optimizējas varbūtība, ka būs iespējams novērtēt pirmās pēcapstrādes metafāzes) pēc devas došanas, ja vien nav zināms cits, piemērotāks un pamatots paraugošanas laiks.

22. Var izmantot citus paraugošanas laikus. Piemēram, kas attiecas uz ķimikālijām, kuras rada no S neatkarīgu ietekmi, lietderīgs var būt agrāks paraugošanas laiks (t.i., agrāk nekā pēc 24 stundām).

▼M8

23. Var izmantot tādu apstrādes režīmu ar atkārtotām devām, kāds rodas apvienojumā ar cita beigupunkta testu, kurā izmantots devu došanas periods 28 dienas (piem., TM B.58); tomēr, lai būtu iespējami atšķirīgi paraugošanas laiki, būtu vajadzīgas vēl citas dzīvnieku grupas. Tātad katrā gadījumā zinātniski jāpamato šāda grafika lietderība.

24. Pirms eitanazēšanas dzīvniekiem intraperitoniāli injicē attiecīgu devu metafāzi apturošas vielas (piem. *Colcemid*® vai kolhicīnu). Pēc tam ar attiecīgiem intervāliem no dzīvniekiem ņem paraugus. Pelēm un žurkām šis intervāls ir aptuveni 3 – 5 stundas.

Devu līmeņi

25. Ja veic iepriekšēju diapazona noteikšanas pētījumu, jo nav piemērotu datu, kas palīdzētu izraudzīties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un devu došanas režīmu, kas tiks izmantots galvenajā pētījumā, un ievērojot ieteikumus par devu diapazona noteikšanas pētījumu izpildi (12). Šajā pētījumā būtu jāorientējas uz maksimālās panesamās devas (*MTD*) apzināšanu; *MTD* definē kā devu, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā izraisa nelielu toksisku ietekmi (piem., anormāla izturēšanās vai reakcijas, neliels ķermeņa masas samazinājums vai citotoksicitāte hematopoētiskajā sistēmā), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ dzīvnieki būtu jāeitanazē (13).

26. Augstāko devu var definēt arī kā devu, kura kaut kādā veidā liecina par toksiskumu spermatogoniju šūnām (piem., samazinās spermatogoniju mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi). Šim samazinājumam nevajadzētu pārsniegt 50 %.

27. Testējamās ķimikālijas, kuras zemā netoksiskā devā iedarbojas bioloģiski specifiski (tādas kā hormoni un mitogēni), un ķimikālijas, kurām ir ļoti izteiktas toksikokinētiskās īpašības, var būt šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi un tātad attiecībā uz devām var būt jānovērtē atsevišķi.

28. Lai iegūtu informāciju par atbildreakciju uz devu, pilnīgā pētījumā jābūt negatīvai kontrolgrupai (18. punkts) un vismaz trijiem devu līmeņiem, kuru atstatuma koeficients parasti ir 2, bet nepārsniedz 4. Ja diapazona noteikšanas pētījumā testējamā ķimikālija toksicitāti nerada vai to nerada saskaņā ar esošajiem datiem, lielākajai vienreizējai devai jābūt 2 000 mg uz kg ķermeņa masas. Ja testējamai ķimikālijai toksiskums tomēr izpaužas, *MTD* jābūt augstākajai ievadītajai devai un izmantotajiem devu līmeņiem būtu jāaptver diapazons no maksimālās devas līdz devai, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem (t.i., sēkliniekiem), ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām. Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk raksturot kvantitatīvo atbildreakciju uz devu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupas. Atsevišķiem testējamo ķimikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var būt mainīgas. Ja testējamā ķimikālija rada toksicitāti, būtu jāizraugās robeždeva plus divas zemākas devas (kā aprakstīts iepriekš). Robeždeva devu došanas periodam 14 dienas vai vairāk ir 1 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā, bet devu došanas periodiem, kas nesasniedz 14 dienas, — 2 000 mg uz kg ķermeņa masas dienā.

▼M8

Devu došana

29. Testi jāplāno, ņemot vērā iespējamo cilvēka ekspozīcijas ceļu. Tāpēc kā pamatotus var izvēlēties tādus ekspozīcijas ceļus kā, piem., ar uzturu, ar dzirdināmo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, perorālu uzņemšanu (ar gavāžu), inhalāciju vai implantāciju. Jebkurā gadījumā ceļš jāizraugās tā, lai mērķaudiem nodrošinātu pietiekamu ekspozīciju. Ja vien intraperitoneāla injekcija nav zinātniski pamatota, tā parasti nav ieteicama, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs. Ja testējamo ķimikāliju piejauc barībai vai dzirdināmam ūdenim, jo īpaši vienreizējas devas gadījumā, jāgādā, lai starp pārtikas un ūdens patēriņu un paraugošanu paietu pietiekami daudz laika, lai būtu iespējams detektēt ietekmes (sk. 33. punktu). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums parasti nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot ūdens šķīdumus, kuru gadījumā var lietot ne vairāk kā 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Ja izmanto lielāku tilpumu (ja dzīvnieku labturības tiesību akti to atļauj), tas jāpamato. Testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa masu saglabātos konstanta.

Novērojumi

30. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā, kurā periodā pēc devu došanas gaidāms ietekmju maksimums, testa dzīvniekiem jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi un jāreģistrē novērotās klīniskās pazīmes. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Pētījuma sākumā, atkārtotas devas pētījumos vismaz reizi nedēļā un eitanāzijas laikā visi dzīvnieki jānosver. Pētījumos, kuri ilgst vismaz vienu nedēļu, vismaz reizi nedēļā jāmēra barības patēriņš. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieks toksiskums, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (13).

Hromosomu preparātu sagatavošana

31. Tūlīt pēc eitanazēšanas no viena vai abiem sēkliniekiem iegūst dīgļšūnu suspensijas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē saskaņā ar vispārpieņemtiem protokoliem (piem., (2) (14) (15)). Šūnas pēc tam uzklāj uz priekšmetstikliņiem un krāso (16) (17). Visi priekšmetstikliņi būtu jāapzīmē ar kodu, lai vērtētājam nebūtu pieejama to identitāte.

Analīze

32. Par katru dzīvnieku būtu jāsaskaita vismaz 200 izteikti izplatījušos metafāžu (3) (11). Ja vēsturiskās negatīvās kontroles biežums ir < 1 %, statistiskās jaudas palielināšanai novērtēšanā par vienu dzīvnieku būtu jānovērtē vairāk nekā 200 šūnu (3). Būtu jāizmanto krāsošanas paņēmieni, ar kuriem iespējams identificēt centromēru.

33. Hromatīdtipa un hromosomtipa aberācijas jāreģistrē atsevišķi un jāklasificē pa apakštipiem (pārrāvumi, apmaiņas). Pārtraukumi būtu jāatspoguļo ziņojumā, bet nebūtu jāņem vērā, nosakot, vai kāda ķimikālija būtiski palielina tādu šūnu incidenci, kurām vērojamas hromosomu aberācijas. Laboratorijā

▼M8

izmantojamām procedūrām būtu jānodrošina, ka hromosomu aberācijas analizē labi apmācīti vērtētāji. Apzinoties, ka priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā daļa metafāzes šūnu bieži vien tiek bojātas un hromosomas zaudē, centromēru skaitam novērtētajās šūnās jābūt vismaz $2n \pm 2$, kur n ir attiecīgās sugas haploidālais hromosomu skaits.

34. Testa nolūks gan ir detektēt strukturālas hromosomu aberācijas, tomēr, ja novēro tādus notikumus kā poliploidālas šūnas vai šūnas ar endoreduplicētām hromosomām, arī to biežumu ir svarīgi atspoguļot (sk. 44. punktu.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

35. Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Katram dzīvniekam nosaka šūnu skaitu, kurās ir strukturālas hromosomu aberācijas, kā arī hromosomu aberāciju skaitu uz vienu šūnu. Hromatīdtipa un hromosomtipa aberācijas, kas klasificētas pēc apakštipa (pārrāvumi, apmaiņas) sarakstā jānorāda atsevišķi, minot skaitu un biežumu eksperimenta grupās un kontrolgrupās. Atsevišķi dokumentē pārtraukumus. Ziņojumā pārtraukumu biežumu atspoguļo, tomēr strukturālo aberāciju kopējā biežuma analīzē to parasti neiekļauj. Ziņojumā atspoguļo gan poliploīdijas, gan/vai to šūnu īpatsvaru, kam ir endoreduplicētas hromosomas, ja šādas parādības ir.

36. Pārskatā jāatspoguļo 30. punktā minētie toksiskuma un klīnisko pazīmju dati.

Pieņemamības kritēriji

37. Testa pieņemamību nosaka, pamatojoties uz šādiem kritērijiem:

— paralēlā negatīvā kontrole atbilst publicētajām normām, kas attiecas uz vēsturisko negatīvo kontroļu datiem (parasti gaida, ka hromosomu aberācijas būs vērojamas > 0 % un $\leq 1{,}5$ % šūnu) un laboratorijas vēsturiskajiem kontroļu datiem (sk. 10. un 18. punktu).

— paralēlās pozitīvās kontrolēs inducētā reakcija atbilst publicētajām vēsturisko pozitīvo kontroļu datu normām vai laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzei, ja tāda ir, un salīdzinājumā ar negatīvajām kontrolēm ir iegūts statistiski būtisks palielinājums (sk. 17. un 18. punktu);

— ir izanalizēts pietiekams šūnu un devu skaits (sk. 28. punktu un 32. punktu).

— maksimālās devas izraudzīšanās kritēriji atbilst 25. un 26. punktā aprakstītajiem.

38. Ja novēro gan mitozi, gan mejozi, par citotoksicitātes mēru visiem devu saņēmušajiem un negatīvās kontroles dzīvniekiem būtu jāizraugās spermatogoniju mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi apkopotā paraugā, kas ir 100 dalošās šūnas uz katru dzīvnieku. Ja novēro tikai mitozi, katram dzīvniekam nosaka mitotisko indeksu vismaz 1 000 šūnām.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

39. Lai iegūtu devas un atbildreakcijas izanalizēšanai pietiekamus datus, jāizanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas.

▼**M8**

40. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja:

— vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— vismaz vienā paraugošanas reizē palielinājums ir devatkarīgs un

— kāds no šiem rezultātiem ir ārpus pieņemamā negatīvo kontroļu datu diapazona vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā), ja tādas ir.

Šajā gadījumā tiek uzskatīts, ka testējamā ķimikālija testa dzīvnieku spermatogoniju šūnās spēj inducēt hromosomu aberācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

41. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja:

— ne ar vienu no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— ne ar vienu no eksperimenta nosacījumiem nav novērojams ar devu saistīts palielinājums un

— visi rezultāti ir pieņemamajā negatīvo kontroļu datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu (ja tādi pieejami) diapazonā (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā).

Testējamo ķimikāliju šajā testa sistēmā tad uzskata par nespējīgu inducēt hromosomu aberācijas kultivētās zīdītāju šūnās. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (11) (18). Negatīvs rezultāts neizslēdz iespējamību, ka ķimikālija varbūt inducē hromosomu aberācijas vēlākās, nepētītās ontoģenēzes fāzēs vai gēnu mutācijas.

42. Nepārprotami pozitīva vai nepārprotami negatīva atbildreakcija nav jāverificē.

43. Ja atbildreakcija nav nepārprotami negatīva vai pozitīva un lai varētu vieglāk noskaidrot kāda rezultāta bioloģisko nozīmīgumu (piem., neizteikts palielinājums vai robežgadījums), dati būtu jāizvērtē, izmantojot ekspertu slēdzienus un/vai tālāku izmeklēšanu, kurā izmanto jau esošos eksperimentu datus, piem., jāapsver, vai pozitīvais rezultāts ir ārpus negatīvās kontroles datu vai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu pieņemamības diapazona (19).

44. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, vai testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, ka rezultāti ir neskaidri.

45. Poliploidālo šūnu skaita palielināšanās var norādīt, ka testējamai ķimikālijai ir potenciāls inhibēt mitotiskos procesus un inducēt skaitliskas hromosomu aberācijas (20). Ja palielinās tādu šūnu skaits, kam ir endoreduplicētas hromosomas, tas var liecināt, ka testējamajai ķimikālijai ir potenciāls inhibēt šūnu cikla norisi (21) (22); tas ir vēl cits, no mitotisku procesu inhibēšanas atšķirīgs mehānisms, kā hromosomās tiek inducētas skaitliskas pārmaiņas (sk. 2. punktu). Tāpēc poliploidālo šūnu incidence un tādu šūnu incidence, kam ir endoreduplicētas hromosomas, jādokumentē atsevišķi.

▼M8

Testēšanas pārskats

46. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Kopsavilkums

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināmas;

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai InChI kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un sastāvdaļu relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— nesēja izraudzīšanās pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā;

— barības, dzirdināmā ūdens vai inhalācijas preparātu sagatavošana;

— preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas), ja tāda veikta.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/celms un tā izmantošanas pamatojums;

— dzīvnieku skaits un vecums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— dzīvnieku unikālās identificēšanas metode;

— īslaicīgiem pētījumiem: dzīvnieku individuālā masa testa sākumā un beigās; par nedēļu ilgākiem pētījumiem: individuālā masa pētījuma laikā un barības patēriņš. Norāda katras grupas dzīvnieku ķermeņa masas diapazonu, vidējo vērtību un standartnovirzi.

Testēšanas nosacījumi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati;

▼**M8**

— diapazona noteikšanas testa rezultāti, ja tas veikts;

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums;

— ievadīšanas ceļa izraudzīšanās pamatojums;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu;

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu;

— nonāvēšanas laika pamatojums;

— metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksiskumu dzīvniekiem, ja tādas ir, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums;

— ja rezultāti ir negatīvi, ar kādām metodēm verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē;

— faktiskā deva (mg uz kg ķermeņa masas dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā);

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti;

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izraudzīšanās pamatojums;

— eitanāzijas metode;

— atsāpināšanas metode (ja tāda izmantota);

— audu izolēšanas procedūras;

— metafāzes apturēšanai izmantojamās ķimikālijas identifikācija, tās koncentrācija un apstrādes ilgums;

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes;

— aberāciju atzīmju kritēriji;

— analizēto šūnu skaits uz vienu dzīvnieku;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti

— dzīvnieka stāvoklis pirms testa perioda un tā laikā, arī toksiskuma pazīmes;

— ķermeņa un orgānu masa nonāvēšanas brīdī (ja devas dotas vairākreiz, ķermeņa masas fiksējumi devu došanas režīma laikā);

— toksiskuma pazīmes;

— mitotiskais indekss;

— spermatogoniju šūnu mitožu attiecība pret pirmo un otro mejotisko metafāzi vai citas mērķaudos vērojamas liecības par eksponētību;

— aberāciju veids un skaits, ko norāda katram dzīvniekam atsevišķi;

— kopējais aberāciju skaits katrā grupā, vidējās vērtības un standartnovirzes;

▼**M8**

— to šūnu skaits katrā grupā, kam ir aberācijas, vidējās vērtības un standartnovirzes;

— ja iespējams, devas–atbildreakcijas sakarība;

— izmantotā statistiskā analīze un metodes;

— līdztekus veiktās negatīvās kontroles dati;

— vēsturiskie negatīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām, standartonovirzēm un ticamības intervālu 95 % (kur tādi pieejami) vai publicētie vēsturiskie negatīvo kontroļu dati, kurus izmanto attiecībā uz šā testa rezultātu pieņemamību;

— paralēlās pozitīvās kontroles dati;

— ploīdijas pārmaiņas, ja tādas tiek novērotas, arī poliploidālo un/vai endoreduplicēto šūnu biežums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(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. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+-Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation 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, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation 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. and 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.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and 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., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and 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, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and 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. Mutation Res., 119, 403-413. (4) Pielikuma B daļā B.23. nodaļu aizstāj ar šādu:

▼M8

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneiploīdija: novirze no normālā diploidālā (vai haploidālā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Centromēra: hromosomas rajons(-i), ar kuru(-iem) šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Hromosomu daudzveidība: hromosomu formu (piem., metacentriskas, akrocentriskas u. tml.) un lielumu daudzveidība.

Hromatīdtipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā atsevišķas hromatīdas pārrāvums vai hromatīdu pārrāvums un savienošanās.

Hromosomtipa aberācija: strukturāls hromosomas bojājums, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un savienošanās vienā un tajā pašā vietā.

Klastogēns: jebkura ķimikālija, kas izraisa strukturālas hromosomālas aberācijas šūnu vai organismu populācijās.

Pārtraukums: ahromatisks bojājums, kas mazāks par vienas hromatīdas platumu un saistīts ar ļoti nelielu hromatīdisku nobīdi.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, arī pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un sasaistes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskais indekss (MI): metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo attiecīgās populācijas proliferācijas pakāpi.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Skaitliska anomālija: testam izmantojamajiem dzīvniekiem raksturīgā parastā hromosomu skaita pārmaiņas.

Poliploīdija: haploidālā hromosomu skaita (n) daudzkārtnis (t.i., 3n, 4n utt.), izņemot diploidālo skaitu.

Strukturālas pārmaiņas: hromosomas struktūras pārmaiņas, kas detektējamas, ar mikroskopu apskatot šūnas to dalīšanās metafāzē, un kas izpaužas kā delēcijas un fragmentācija.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: Ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli

▼M7

———————

▼B

B.25. **PĀRMANTOJAMO TRANSLOKĀCIJU NOTEIKŠANA PELĒM**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. METODES BŪTĪBA

Veicot pārmantojamo translokāciju noteikšanu pelēm, pirmās paaudzes pēcnācējiem reģistrē strukturālas un skaitliskas hromosomu izmaiņas zīdītāju dzimumšūnās. Novērotās hromosomu izmaiņas ietver reciprokās translokācijas un, ja analizē arī sievišķos pēcnācējus, X hromosomas zudumu. Hromosomu translokāciju nesējiem un XO mātītēm ir pazemināta auglība, ko izmanto, lai atlasītu F_1 pēcnācējus citoģenētiskās analīzes veikšanai. Dažas translokācijas (starp X hromosomu un autosomu, kā arī starp centromēru un telomēru) izraisa pilnīgu sterilitāti. Translokāciju citoģenētiskajai analīzei izmanto vīrišķo īpatņu (F_1 tēviņu vai F_1 mātīšu vīrišķo pēcnācēju) šūnas mejozes ciklā, diakinēzes-metafāzes I laikā. XO mātītes var citoģenētiski atšķirt pēc tā, ka to kaula smadzeņu šūnās mitozes laikā parādās tikai 39 hromosomas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmās vielas izšķīdina izotoniskā sāls šķīdumā. Ja vielas nešķīst ūdenī, tās izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Pārbaudāmās vielas šķīdumam jābūt tikko pagatavotam. Ja izmanto šķīdinātāju, kas atvieglo vajadzīgas devas ievadīšanu, tas nedrīkst reaģēt ar pārbaudāmo vielu vai būt toksisks.

Ievadīšanas veids

Parasti izmanto perorālu intubāciju vai intraperitoniālu injekciju. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Šim nolūkam izmanto peles, jo to pavairošana un citoloģiskā izmeklēšana nerada īpašas grūtības. Var izmantot jebkuru peļu līniju. Tomēr ir svarīgi, lai vidēji katrā metienā būtu vairāk nekā astoņi mazuļi, un šim skaitam jābūt diezgan nemainīgam.

Izmanto veselus un dzimumgatavību sasniegušus dzīvniekus.

▼B

Dzīvnieku skaits

Dzīvnieku skaits ir atkarīgs no spontāno translokāciju biežuma un no minimālā inducēto translokāciju skaita, kas vajadzīgs, lai iegūtu pozitīvu rezultātu.

Parasti analizē vīrišķos F_1 pēcnācējus. Katrā izmēģinājumu dzīvnieku grupā pārbauda vismaz 500 vīrišķo F_1 pēcnācēju. Ja pārbauda arī sievišķos F_1 pēcnācējus, ir jābūt 300 tēviņiem un 300 mātītēm.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Jābūt attiecīgiem kontroles datiem, kas iegūti tagad un iepriekšējos izmēģinājumos. Ja tajā pašā laboratorijā ir pieejami atbilstoši pozitīvās kontroles rezultāti, kas iegūti nesen veiktos eksperimentos, tos var izmantot tagadējās pozitīvās kontroles vietā.

Izmantotās devas

Pārbauda vienu vielas devu, parasti tā ir lielākā deva, kurai novēro minimālu toksisku iedarbību un kura neietekmē dzīvnieku reproduktīvo uzvedību vai izdzīvošanu. Lai noteiktu, kā vielas iedarbība mainās atkarībā no devas, papildus jābūt divām mazākām devām. Ja vielas nav toksiskas, tās jāizmanto pēc iespējas lielākā devā.

Testa norise

Vielas aplikācija un dzīvnieku pārošana

Pastāv divas aplikācijas shēmas. Pārbaudāmo vielu visbiežāk ievada vienreiz. Pārbaudāmo vielu var arī ievadīt 7 dienas nedēļā 35 dienu laikā. Pārošanās reižu skaits pēc aplikācijas ir atkarīgs no aplikācijas shēmas, un tam jāaptver visas dzimumšūnu attīstības stadijas. Beidzoties pārošanās laikam, katru mātīti ievieto atsevišķā būrī. Pēc mātītes atnešanās reģistrē dienu, metiena lielumu un pēcnācēju dzimumu. Visus vīrišķos pēcnācējus atšķir no mātītes, bet sievišķos pēcnācējus tālāk neizmanto, ja nav paredzēts citādi.

Translokāciju heterozigotātes tests

Var izvēlēties vienu no diviem iespējamiem paņēmieniem:

— F_1 pēcnācēju auglības tests un iespējamo translokāciju nesēju citoģenētiskā analīze,

— visu vīrišķo F_1 pēcnācēju citoģenētiskā analīze bez iepriekšējas atlases pēc auglības.

a) Auglības tests

Par to, ka F_1 īpatņa auglība ir pazemināta, var spriest pēc metiena lieluma un/vai dzemdes satura analīzes, ko veic mātītēm pēc pārošanās ar šo īpatni.

Izmantotajai peļu līnijai jānosaka normālas un pazeminātas auglības kritēriji.

▼B

Dati par metienu lielumu. F_1 tēviņus katru atsevišķā būrī sapāro ar tajā pašā eksperimentā iegūtām mātītēm vai ar mātītēm no tās pašas dzīvnieku populācijas. Dzīvniekus apskata katru dienu, sākot no 18. dienas pēc pārošanās. Atnešanās brīdī reģistrē metiena lielumu un F_2 pēcnācēju dzimumu, tie vairs netiek izmantoti. Jāpārbauda sievišķie F_1 pēcnācēji, F_2 pēcnācējus no maziem metieniem patur turpmākai analīzei. Sievišķos translokāciju nesējus identificē, veicot translokāciju citoģenētisko analīzi vismaz kādam no vīrišķajiem pēcnācējiem. XO mātītes var pazīt pēc tā, ka to pēcnācēju dzimumu (tēviņi: mātītes) skaitliskā attiecība mainās no 1:1 uz 1:2. Ja izmanto secīgo metodi, normālos F_1 dzīvniekus tālāk nepārbauda, ja pirmais F_2 metiens atbilst vai pārsniedz iepriekš noteikto normālo lielumu, pretējā gadījumā pārbauda otro vai trešo F_2 metienu.

F_1 dzīvniekus, kurus pat pēc triju F_2 metienu novērošanas nevar atzīt par normāliem, pārbauda, veicot dzemdes satura analīzi ar tiem sapārotajām mātītēm, vai tiešā veidā, veicot tiem citoģenētisko analīzi.

Dzemdes satura pārbaude. Metienu lieluma samazināšanās dzīvniekiem ar translokācijām ir izskaidrojama ar embriju bojāeju, tādējādi liels nedzīvu implantu skaits norāda uz to, ka pārbaudāmais dzīvnieks ir translokācijas nesējs. Katru analizējamo F_1 tēviņu sapāro ar divām vai trim mātītēm. Par aizmešanos liecina maksts embols, ja to konstatē, ik rītu apskatot dzīvniekus. Mātītes nokauj pēc 14–16 dienām un reģistrē dzemdē atrasto dzīvo un nedzīvo implantu skaitu.

b) Citoģenētiskā analīze

No sēkliniekiem izgatavo gaisā žāvētus preparātus. Translokāciju nesējus identificē pēc multivalentu konfigurācijām, ko novēro primārajos spermatocītos diakinēzes-metafāzes I laikā. Vismaz divas šūnas ar multivalentiem ir pietiekams pierādījums tam, ka analizējamais dzīvnieks ir translokācijas nesējs.

Ja dzīvnieku pavairošana noris bez atlases, citoģenētiski pārbauda visus F_1 tēviņus. Katram tēviņam mikroskopiski izvērtē vismaz 25 šūnas, kas iegūtas diakinēzes-metafāzes I laikā. F_1 tēviņiem, kam ir nelieli sēklinieki vai kam mejoze apstājusies pirms diakinēzes, kā arī F_1 mātītēm, ja ir aizdomas, ka tām ir XO genotips, pārbauda spermatogoniju vai kaula smadzeņu šūnas mitozes metafāzē. Ja ikvienā no 10 šūnām novēro neierasti garu un/vai īsu hromosomu, tas norāda uz to, ka ir notikusi īpaša translokācija, kas izraisa vīrišķo sterilitāti (c/t translokācijas tips). Dažas translokācijas starp X hromosomu un autosomu, kas izraisa vīrišķo sterilitāti, var konstatēt tikai pēc mitotisko hromosomu diferenciālās krāsošanas. Ja ikvienā no 10 mitozēm novēro tikai 39 hromosomas, tas liecina par to, ka mātītei ir XO genotips.

2. **DATI**

Datus apkopo tabulā.

Ziņojumā norāda metienu vidējo lielumu un dzimumu skaitlisko attiecību atnešanās un mazuļu atšķiršanas brīdī, ko novēro katrā pārošanās termiņā.

▼B

Pēc F_1 dzīvnieku auglības pārbaudes norāda metienu vidējo lielumu pēc katras normālas pārošanās un katra atsevišķa metiena lielumu F_1 translokāciju nesējiem. Pēc dzemdes satura pārbaudes norāda dzīvo un nedzīvo implantu vidējo skaitu normāliem dzīvnieku pāriem un dzīvo un nedzīvo implantu skaitu pēc katras F_1 translokāciju nesēju pārošanās.

Pēc diakinēzes-metafāzes I citoģenētiskās analīzes katram translokāciju nesējam norāda multivalentu konfigurāciju tipu skaitu un kopējo šūnu skaitu.

Steriliem F_1 īpatņiem norāda kopējo pārošanās skaitu un pārošanās perioda ilgumu. Norāda arī sēklinieku svaru un pievieno citoģenētiskās analīzes aprakstu.

Ziņojumā iekļauj metienu vidējo lielumu XO mātītēm, F_2 pēcnācēju dzimumu skaitlisko attiecību un citoģenētiskās analīzes rezultātus.

Ja iepriekš veic varbūtējo F_1 translokāciju nesēju atlasi, izmantojot auglības pārbaudi, tabulās jāiekļauj ziņas par to, cik dzīvniekiem ir novērota translokācijas heterozigotāte.

Ziņojumā arī jāietver negatīvās un pozitīvās kontroles dati.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā peļu līnija, dzīvnieku vecums, apstrādāto dzīvnieku svars,

— katra dzimuma vecākdzīvnieku skaits izmēģinājumu un kontroles grupās,

— testa apstākļi, aplikācijas shēma, izmantotās devas, šķīdinātāji, pārošanās shēma,

— katras mātītes pēcnācēju skaits un dzimums, to pēcnācēju skaits un dzimums, kam veikta translokāciju analīze,

— translokāciju analīzes termiņi un kritēriji,

— translokāciju nesēju skaits un padziļināts raksturojums, vajadzības gadījumā norādot datus par pārošanu un dzemdes satura pārbaudi,

— citoģenētikas metodes un sīks mikroskopiskās analīzes apraksts, vēlams, pievienojot attēlus,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

▼B

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

▼B

B.26. **SUBHRONISKĀS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS – ATKĀRTOTO DEVU 90 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR GRAUZĒJIEM**

1. **METODE**

Šī subhroniskās orālās toksicitātes testa metode ir ESAO TG 408 (1998) kopija.

1.1. IEVADS

Pārbaudot un novērtējot ķimikālijas toksiskās īpašības, subhroniskās orālās toksicitātes noteikšanu, izmantojot atkārtotas devas, var izdarīt pēc tam, kad no akūtās vai atkārtotās devas 28 dienu toksicitātes testiem ir iegūta sākotnējā informācija. 90 dienu pētījums sniedz informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, kas varētu rasties no atkārtotas iedarbības ilgākā laika posmā, ietverot laiku pēc zīdīšanas pārtraukšanas līdz pieauguša dzīvnieka vecuma sasniegšanai. Pētījums sniegs informāciju par lielākajām toksiskajām ietekmēm, norādīs mērķa orgānus un akumulācijas iespēju, un tas var aptuveni novērtēt iedarbības līmeni, pie kura nav novērojama negatīva ietekme un kurš būtu izmantojams, izvēloties devu līmeņus hroniskās iedarbības pētījumiem un nosakot drošības kritērijus iedarbībai uz cilvēkiem.

Šī metode turklāt pievērš uzmanību neiroloģiskajiem galapunktiem un norāda uz imunoloģisko ietekmi un ietekmi uz reproduktīvo funkciju. Ir uzsvērta arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas. Šajā pētījumā būtu jāidentificē ķīmiskās vielas, kuras varētu izraisīt uz orgāniem neirotoksisku, imunoloģisku ietekmi vai ietekmi uz reproduktīvajiem orgāniem, kas varētu pamatot turpmākus padziļinātus pētījumus.

Skatīt arī vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Deva: ievadītais testa vielas daudzums. Devu izsaka kā svaru (g, mg) vai kā testa vielas svaru uz izmēģinājuma dzīvnieka svara vienību (piemēram, mg/kg), vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas).

Dozēšana: vispārējs termins, kas ietver devu, tās biežumu un došanas ilgumu.

NOAEL: saīsinājums devai, pie kuras nav novērojama negatīva ietekme, un tas ir lielākais devas līmenis, pie kura nav novērojami ar iedarbību saistīti negatīvi rezultāti.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielu dažādu līmeņu devās katru dienu perorāli ievada vairākām eksperimenta dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai 90 dienu ilgā laika posmā. Vielas ievadīšanas laikā rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa laikā nobeidzas vai tiek nogalināti, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus arī nogalina, un tiem izdara autopsiju.

▼B

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sagatavošana**

Būtu jāizmanto veseli dzīvnieki, kas ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz piecas dienas un kas nav iepriekš pakļauti eksperimenta procedūrām. Būtu jāapraksta testa dzīvnieku suga, šķirne, izcelsme, dzimums, svars un/vai vecums. Dzīvnieki būtu jāiedala kontroles un vielas saņemšanas grupās pēc nejaušās izvēles. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Katram dzīvniekam piešķir individuālu identifikācijas numuru.

1.4.2. **Devu sagatavošana**

Testa vielu ievada, dzīvnieku mākslīgi barojot vai ar barību vai ar dzeramo ūdeni. Perorālās ievadīšanas metode ir atkarīga no pētījuma mērķa un testa materiāla fizikālajām/ķīmiskajām īpašībām.

Vajadzības gadījumā testa vielu šķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīduma/suspensijas izmantošanu un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testa vielas stabilitāte ievadīšanas apstākļos.

1.4.3. **Testa apstākļi**

1.4.3.1. *Izmēģinājuma dzīvnieki*

Testos galvenokārt izmanto žurkas, lai gan var izmantot arī citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Jāizmanto jauni, veseli, pieauguši parasti laboratorijās izmantojamu līniju dzīvnieki. Mātītēm jābūt nedzemdējušām un negrūsnām. Devu došana jāsāk iespējami ātrāk tūlīt pēc zīdīšanas izbeigšanas un katrā ziņā, pirms dzīvnieki sasniedz deviņu nedēļu vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījuma iepriekšēju pētījumu, abos pētījumos jāizmanto vienas līnijas un izcelsmes dzīvnieki.

1.4.3.2. *Skaits un dzimums*

Katrā devu līmenī jāizmanto vismaz 20 dzīvnieki (10 mātītes un 10 tēviņi). Ja ir plānota dzīvnieku nogalināšana testa laikā, kopējais dzīvnieku skaits ir jāpalielina par dzīvnieku skaitu, ko paredzēts nogalināt pirms pētījuma pabeigšanas. Pamatojoties uz iepriekšējām zināšanām par ķīmisko vielu vai tās tuvu analogu, būtu jāapsver papildu 10 dzīvnieku grupas (pa pieciem no katra dzimuma) iekļaušana kontroles grupā un vislielākās devas grupā toksisko ietekmju atgriezeniskuma vai noturības novērošanai pēc testa vielas saņemšanas laika posma. Šā novērošanas laika posma ilgums jānosaka atbilstīgi novērotajām ietekmēm.

▼B

1.4.3.3. *Devu lielums*

Izmanto vismaz trīs devu līmeņus un veic vienlaicīgu kontroles eksperimentu, izņemot gadījumu, kad veic pieļaujamā daudzuma testu (skatīt 1.4.3.4. punktu). Devu līmeņus var noteikt, pamatojoties uz atkārtotās devas vai diapazona atrašanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testa vielu vai radniecīgiem materiāliem. Ja vien lielāko devas līmeni neierobežo testa vielas fizikāli ķīmiskās īpašības vai bioloģiskā ietekme, šis līmenis jāizvēlas ar mērķi izraisīt toksicitāti, bet ne nāvi vai smagas ciešanas. Devu līmeņi samazināšanās secībā jāizvēlas tā, lai parādītu atbildes reakcijas atkarību no devu lieluma un lai mazākais līmenis būtu līmenis, pie kura nav novērojama negatīva ietekme (*NOAEL*). Lai noteiktu intervālus starp devu līmeņiem samazināšanās secībā, bieži optimāli ir izmantot koeficientu 2 līdz 4 un bieži ir labāk pievienot ceturto testa grupu nekā izmantot starp devu līmeņiem ļoti lielus intervālus (piemēram, koeficientu, kas lielāks par 6–10).

Kontroles grupa ir grupa, kas nesaņem testa vielu, vai grupa, kas saņem nesēju, ja testa vielas ievadīšanā izmanto nesēju. Izņemot testa vielas došanu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar testa vielu saņēmēju grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesēju, kontroles grupa saņem nesēju lielākajā izmantotajā tilpumā. Ja testa vielu ievada ar barību un viela izraisa samazinātu barības uzņemšanu, tad var būt noderīgas kontroles grupas, ko baro pa pāriem, lai izšķirtu, vai samazinājums ir saistīts ar garšas īpašībām vai ar toksikoloģiskajām pārmaiņām testa modelī.

Vērība būtu jāvelta šādām nesēja un attiecīgi citu piedevu īpašībām: ietekmēm uz uzsūkšanos, sadalījumu, vielmaiņu vai testa vielas aizturi; ietekmēm uz testa vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; un ietekmei uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu.

1.4.3.4. *Pieļaujamā daudzuma tests*

Ja testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, izmantojot šim pētījumam aprakstīto procedūru, nav novērota negatīva ietekme un ja, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām, var pamatoti uzskatīt, ka viela nav toksiska, pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem var uzskatīt par nevajadzīgu. Pieļaujamā daudzuma tests ir izmantojams, izņemot gadījumus, kad vielas iedarbība uz cilvēku norāda, ka jālieto lielāks devas līmenis.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Devu ievadīšana**

Dzīvniekiem testa vielu dod ik dienu septiņas dienas nedēļā 90 dienu ilgā laika posmā. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ja testa vielu ievada ar barošanas zondi, tā ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli dzīvniekiem jāievada vienā devā. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Šķīduma tilpumam nevajadzētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīduma gadījumus, kad var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, pielāgojot koncentrāciju tā, lai pie visiem devu līmeņiem tilpums būtu vienāds.

▼B

Ir svarīgi nodrošināt, lai vielām, kuras ievada ar barību vai dzeramo ūdeni, testā iesaistītās vielas īpašības neizjauktu parasto barības vai ūdens līdzsvaru. Ja testa vielu ievada ar barību, var izmantot nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas) vai nemainīgu devas līmeni, ņemot vērā dzīvnieka ķermeņa svaru; ir jānorāda, kuru alternatīvu izmanto. Vielām, kuras ievada ar barošanas zondi, devas jādod vienā laikā katru dienu un pēc vajadzības jāpielāgo, lai saglabātu nemainīgu devas līmeni, ņemot vērā dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja 90 dienu pētījumu veic kā iepriekšēju pētījumu ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījumam, tad tāda pati barība būtu jāizmanto abos pētījumos.

1.5.2. **Novērojumi**

Novērošanas laika posmam būtu jābūt vismaz 90 dienu ilgam. Papildu grupas dzīvniekus, kuri paredzēti tālākai novērošanai, noteiktu laika posmu vajadzētu turēt bez vielas saņemšanas, lai noteiktu toksisko ietekmju noturību vai atveseļošanos no tām.

Jāizdara vispārēji klīniskie novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma laika posmu pēc došanas. Jāprotokolē dzīvnieku klīniskais stāvoklis. Vismaz divas reizes dienā, parasti dienas sākumā un beigās, ir jāpārbauda, vai dzīvniekiem neparādās nāves tuvošanās un nāves pazīmes.

Vismaz vienu reizi pirms pirmās pakļaušanas iedarbībai (lai varētu izdarīt salīdzināšanu vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vienu reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojami visiem dzīvniekiem. Šie novērojumi būtu jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas krātiņa, ieteicams – standartnožogojumā katru reizi vienā un tajā pašā laikā. Novērojumi rūpīgi jāprotokolē, vēlams izmantot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai pārmaiņas novērošanas apstākļos būtu minimālas. Protokolējamās pazīmēs būtu jāiekļauj pārmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādā, sekrēcijas izdalīšanās un veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametrs un nerakstura elpošana), bet ar to nebūtu jāaprobežojas. Būtu jāprotokolē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī klonisko un tonisko kustību klātesamība, pārmaiņas stereotipos (piemēram, pārmērīga kopšanās, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, sakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (1).

Oftalmoloģiskā apskate, izmantojot oftalmoskopu vai līdzīgu piemērotu ierīci, jāveic pirms testa vielas ievadīšanas un pētījuma beigās, vēlams visiem dzīvniekiem, bet vismaz lielākās devas grupas un kontroles grupas dzīvniekiem. Ja atklāj pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki.

Uz iedarbības laika posma beigām un katrā ziņā ne vēlāk kā 11. nedēļā ir jāpārbauda sensorās reakcijas uz dažādu veidu kairinātājiem (1) (piemēram, uz dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinātājiem) (2) (3) (4), kā arī jānovērtē tvēriena stiprums (5) un motoriskā aktivitāte (6). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var ieviest, ir doti attiecīgajās norādēs. Tomēr var izmantot arī alternatīvas procedūras, ne tikai tās, kuras minētas norādēs.

Funkcionālos novērojumus, kurus veic uz pētījuma beigām, var neveikt, ja funkcionālo novērojumu dati ir pieejami no citiem pētījumiem un katras dienas klīniskajos novērojumos nav atklāti nekādi funkcionāli trūkumi.

▼B

Izņēmuma gadījumos funkcionālos novērojumus var arī neveikt tām dzīvnieku grupām, kurām citādi atklātas toksicitātes pazīmes tādā mērā, kas ievērojami traucētu funkcionālā testa norisi.

1.5.2.1. *Ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš*

Visi dzīvnieki jānosver vismaz vienu reizi nedēļā. Barības patēriņa noteikšana jāizdara vismaz ik nedēļu. Ja testa vielu ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš arī jānosaka vismaz ik nedēļu. Ūdens patēriņu var ņemt vērā arī barošanas vai mākslīgās barošanas pētījumos, kuru laikā dzeršanas intensitāte var mainīties.

1.5.2.2. *Hematoloģija un klīniskā bioķīmija*

Asins paraugi jāņem no noteiktas vietas un vajadzības gadījumā jāglabā piemērotos apstākļos. Testa laika posma beigās paraugus noņem tieši pirms dzīvnieku nogalināšanas procedūras vai kā daļu no tās.

Testa laika posma beigās un tad, kad asins paraugus ņem testa laika posma vidū, jāizdara šādas hematoloģiskās analīzes: hematokrītu, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocitārās formulas, trombocītu skaita un asins recēšanas laika/spējas noteikšana.

Klīniskās bioķīmijas noteikšana, lai izpētītu galvenās toksiskās ietekmes audos, un jo īpaši ietekmes uz nierēm un aknām, jāveic ar tiem asins paraugiem, kuri paņemti no katra dzīvnieka tieši pirms dzīvnieku nogalināšanas procedūras vai kā daļa no tās (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kuri atrasti mirstoši un/vai nogalināti pētījuma vidū). Līdzīgi kā hematoloģiskos pētījumos paraugus klīniskajiem bioķīmijas testiem var ņemt arī testa laika posma vidū. Ir ieteicams nedot dzīvniekiem barību uz nakti pirms asins analīžu ņemšanas ([1]). Plazmā vai serumā jānosaka nātrijs, kālijs, glikoze, kopējais holesterīns, urīnviela, urīnvielas slāpeklis asinīs, kreatīns, kopējās olbaltumvielas un albumīns un vairāk par diviem fermentiem, kas norāda uz hepatocelulārajām ietekmēm (piemēram, alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, alkalīnfosfatāze, gamma glutamiltranspeptidāze un sorbīta dehidrogenāze). Var iekļaut arī papildu fermentu (aknu vai citas izcelsmes) un žultsskābju noteikšanu, kas varētu sniegt noderīgu informāciju pie dažiem nosacījumiem.

Pēc izvēles pēdējās pētījuma nedēļas laikā, izmantojot urīna tilpuma savākšanu noteiktā laikā, var veikt šādas urīna analīzes: izskata, daudzuma, osmolaritātes vai īpatnējā svara, pH, olbaltumvielu, glikozes un asins/asins šūnu analīzes.

Turklāt būtu jāapsver iespēja veikt vispārēju audu bojājumu seruma marķieru izpēti. Citas noteikšanas, kuras būtu jāveic, ja testa vielas zināmās īpašības ietekmē attiecīgās metaboliskās īpašības vai ja ir aizdomas par tādu ietekmi, iekļauj kalciju, fosforu, tukšas dūšas triglicerīdus, specifiskus hormonus, methemoglobīnu un holīnesterāzi. Šīs noteikšanas ir jāizdara, ja ķīmiskās vielas pieder pie dažām klasēm vai atkarībā no konkrētā gadījuma.

([1]) Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekiem pirms asins ņemšanas uz nakti nedot barību. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami izraisītu palielinātu datu izkliedi, kam būtu tendence maskēt smalkas ietekmes un kas padarītu interpretāciju grūtu. No otras puses, barības nedošana uz nakti var traucēt dzīvnieku vispārējo vielmaiņu un – jo īpaši barošanas pētījumos – var izjaukt testa vielas ikdienas iedarbību. Ja ir pieņemta barības nedošana uz nakti, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas.

▼B

Visumā ir vajadzīga elastīga pieeja atkarībā no sugām un novērotām un/vai paredzamām attiecīgās vielas ietekmēm.

Ja vēsturiskie dati par normas robežām ir nepietiekami, būtu jāapsver, vai pirms pētījuma sākšanas nebūtu jānosaka hematoloģiskie un klīniskās bioķīmijas mainīgie lielumi; vispār šos datus iegūt pirms devu došanas nav ieteicams (7).

1.5.2.3. *Autopsija*

Pētījumā visus dzīvniekus pakļauj pilnai detalizētai autopsijai, kas iekļauj ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobuma, torakālā dobuma un vēdera dobuma un šo dobumu satura rūpīgu apskati. Visu dzīvnieku (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kas atrasti mirstoši un/vai nogalināti pētījuma laikā) aknas, nieres, virsnieru dziedzeri, sēklinieki, dzemde, olnīcas, aizkrūts dziedzeris, liesa, smadzenes un sirds jāatbrīvo no attiecīgajiem apkārtējiem audiem un iespējami drīz pēc secēšanas jānosver, lai izvairītos no izžūšanas.

Šādi audi jāglabā vispiemērotākajā fiksācijas vidē audu veida izmeklēšanai un paredzētai vēlākai histopatoloģiskai izmeklēšanai: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvi apgabali, iekļaujot lielās smadzenes, smadzenītes un iegarenās smadzenes/smadzeņu tiltu), muguras smadzenes (trijos līmeņos: kakla daļā, torakālajā vidusdaļā un jostasvietas daļā), hipofīze, vairogdziedzeris, epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzeris, barības vads, siekalu dziedzeri, kuņģis, tievās un resnās zarnas (iekļaujot kopu limfātiskos jeb Peijera mezgliņus), aknas, aizkuņģa dziedzeris, nieres, virsnieru dziedzeri, liesa, sirds, traheja un plaušas (konservētas, piepūšot ar fiksatoru un pēc tam iegremdējot), aorta, dzimumdziedzeri, dzemde, akcesorie dzimumorgāni, piena dziedzeri, prostata, urīnpūslis, žultspūslis (pelēm), limfmezgli (vēlams – viens limfmezgls, kas ir uz ievadīšanas ceļa, un otrs, kas ir attālu no ievadīšanas ceļa, lai konstatētu sistēmiskās ietekmes), perifēriskais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs), vēlams – tiešā muskuļa tuvumā, kaulu smadzeņu izgriezums (un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts), āda un acis (ja oftalmoloģiskās apskates laikā novērotas pārmaiņas). No klīniskajiem un citiem novērojumiem var rasties doma papildus izmeklēt citus audus. Jākonservē arī orgāni, ko uzskata par iespējamiem mērķa orgāniem, pamatojoties uz zināmām testa vielas īpašībām.

1.5.2.4. *Histopatoloģija*

Visu kontroles grupas un lielākās devas grupas dzīvnieku konservētajiem orgāniem un audiem jāizdara pilna histopatoloģiskā izmeklēšana. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas, minētā izmeklēšana jāpaplašina uz visu citu devu grupu dzīvniekiem.

1.5.2.5. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi.

Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, kuros ietekmes konstatētas vielu saņēmušajām grupām.

▼B

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

2.1. DATI

Būtu jāsniedz dati par katru atsevišķu dzīvnieku. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, katrai testa grupai parādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, dzīvnieku skaitu, kas testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nogalināti, un katras nobeigšanās vai humānas nogalināšanas laiku, dzīvnieku skaitu, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, iekļaujot toksisko ietekmju sākuma laiku, ilgumu un smagumu, dzīvnieku skaitu, kam novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo daudzumu, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi.

Attiecīgā gadījumā skaitliskie rezultāti būtu jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistisko metodi. Statistiskās metodes un analizējamie dati būtu jāizvēlas, plānojot pētījumu.

2.2. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

2.2.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis, tīrība un fizikāli ķīmiskās īpašības,

— identificēšanas dati,

— nesējs (attiecīgā gadījumā): nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

2.2.2. **Testa suga:**

— izmantotā suga un līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība utt.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

2.2.3. **Testa apstākļi:**

— devu izvēles pamatojums,

— sīki izstrādāts apraksts par testa vielas sagatavošanu/pievienošanu barībai, iegūto sagatavotā maisījuma koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— sīki izstrādāts testa vielas ievadīšanas apraksts,

— testa vielas faktiskās devas (mg/kg ķermeņa masas dienā) un – attiecīgā gadījumā – koeficients, lai testa vielas koncentrāciju (milj. daļās) barībā/dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajās devās,

— sīki izstrādāts barības un ūdens kvalitātes apraksts.

2.2.4. **Rezultāti:**

— ķermeņa svars un ķermeņa svara pārmaiņas,

— attiecīgā gadījumā – barības patēriņš un ūdens patēriņš,

— dati par jutību pret toksicitāti pēc dzimuma un devu līmeņa, iekļaujot toksicitātes pazīmes,

▼B

— klīnisko novērojumu būtība, smagums un ilgums (vai tie ir vai nav atgriezeniski),

— oftalmoloģiskās apskates rezultāti,

— sensorās aktivitātes, tvēriena stipruma un motoriskās aktivitātes novērtējums (attiecīgā gadījumā),

— hematoloģisko testu dati ar attiecīgajām normas robežām,

— klīniskās bioķīmijas testu dati ar attiecīgajām normas robežām,

— ķermeņa beigu svars, orgānu svars un orgānu/ķermeņa svara attiecība,

— autopsijas rezultāti,

— sīki izstrādāts visu histopatoloģijas rezultātu apraksts,

— absorbcijas dati, ja ir pieejami,

— attiecīgā gadījumā – statistiskās apstrādes rezultāti.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 999–1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, p. 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, p. 267–283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, p. 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, p. 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, p. 198–201.

▼B

B.27. **SUBHRONISKĀS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS – ATKĀRTOTO DEVU 90 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR DZĪVNIEKIEM, KAS NAV GRAUZĒJI**

1. **METODE**

Šī subhroniskās orālās toksicitātes testa metode ir ESAO TG 409 (1998) kopija.

1.1. IEVADS

Pārbaudot un novērtējot ķimikālijas toksiskās īpašības, subhroniskās orālās toksicitātes noteikšanu, izmantojot atkārtotas devas, var izdarīt pēc tam, kad no akūtās vai atkārtotās devas 28 dienu toksicitātes testiem ir iegūta sākotnējā informācija. 90 dienu pētījums sniedz informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, kas varētu rasties no atkārtotas iedarbības straujas augšanas laika posmā līdz jauna pieauguša dzīvnieka attīstības posma sasniegšanai. Pētījums sniegs informāciju par lielākajām toksiskajām ietekmēm, norādīs mērķa orgānus un akumulācijas iespēju, un tas var aptuveni novērtēt iedarbības līmeni, pie kura nav novērojama negatīva ietekme un kurš būtu izmantojams, izvēloties devu līmeņus hroniskās iedarbības pētījumiem un nosakot drošības kritērijus iedarbībai uz cilvēkiem.

Testa metode ļauj identificēt ķīmiskās iedarbības negatīvās ietekmes uz dzīvniekiem, kas nav grauzēji, un tā būtu jāizmanto vienīgi:

— ja citos pētījumos novērotās ietekmes norāda uz vajadzību tās noskaidrot/raksturot, izmantojot citu sugu, kas nav grauzēji, vai

— ja toksikokinētiskie pētījumi rāda, ka tādas sugas izmantošana, kas nav grauzēji, ir vispiemērotākā laboratorijas dzīvnieku izvēle, vai

— ja citi īpaši iemesli pamato tādas sugas izmantošanu, kas nav grauzēji.

Skatīt arī vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Deva: ievadītais testa vielas daudzums. Devu izsaka kā svaru (g, mg) vai kā testa vielas svaru uz izmēģinājuma dzīvnieka svara vienību (piemēram, mg/kg) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas).

Dozēšana: vispārējs termins, kas ietver devu, tās biežumu un došanas ilgumu.

NOAEL: saīsinājums devai, pie kuras nav novērojama negatīva ietekme, un tas ir lielākais devas līmenis, pie kura nav novērojami negatīvi ar iedarbību saistīti rezultāti.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielu dažādu līmeņu devās katru dienu perorāli ievada vairākām eksperimenta dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai 90 dienu ilgā laikā. Vielas ievadīšanas laikā rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa laikā nobeidzas vai tiek nogalināti, izdara autopsiju un, testu nobeidzot, izdzīvojušos dzīvniekus arī nogalina un tiem izdara autopsiju.

▼B

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Parasti izmantojamā tādu dzīvnieku suga, kas nav grauzēji, ir suņi, kam būtu jābūt noteiktas šķirnes; bieži izmanto bīglus. Var izmanto arī citas sugas, piemēram, cūkas, pundurcūkas. Izmantot primātus nav ieteicams, un to izmantošana būtu jāpamato. Jāizmanto jauni, veseli dzīvnieki, un suņu gadījumā devu došanu būtu vēlams sākt 4–6 mēnešu vecumā un ne vēlāk kā deviņu mēnešu vecumā. Ja pētījumu veic kā ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījuma iepriekšēju pētījumu, abos pētījumos jāizmanto viena un tā pati suga/šķirne.

1.4.2. **Dzīvnieku sagatavošana**

Izmanto veselus, jaunus dzīvniekus, kas ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos un kas nav iepriekš pakļauti eksperimenta procedūrām. Aklimatizācijas ilgums ir atkarīgs no izraudzītās testa sugas un dzīvnieku izcelsmes. Tas suņiem vai šim nolūkam audzētām cūkām no vietējas audzētavas ir ieteicams vismaz piecas dienas un šiem dzīvniekiem ar ārēju izcelsmi – vismaz divas nedēļas. Jāapraksta testa dzīvnieku suga, šķirne, izcelsme, dzimums, svars un/vai vecums. Dzīvnieki jāiedala kontroles un testa grupās pēc nejaušās izvēles. Būri jāizvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējo ietekmi iespējami samazinātu. Katram dzīvniekam jāpiešķir individuāls identifikācijas numurs.

1.4.3. **Devu sagatavošana**

Testa vielu var ievadīt ar barību vai ar dzeramo ūdeni, caur kuņģa zondi vai kapsulās. Perorālās ievadīšanas metode ir atkarīga no pētījuma nolūka un testa materiāla fizikāli ķīmiskajām īpašībām.

Vajadzības gadījumā testa vielu šķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīduma/suspensijas izmantošanu un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testa vielas stabilitāte ievadīšanas apstākļos.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katrā devu līmenī jāizmanto vismaz astoņi dzīvnieki (četras mātītes un četri tēviņi). Ja ir plānota dzīvnieku nogalināšana eksperimenta laikā, skaits jāpalielina par dzīvnieku skaitu, ko paredzēts nogalināt pirms pētījuma pabeigšanas. Dzīvnieku skaitam pētījuma beigās jābūt pietiekamam, lai statistiski nozīmīgi novērtētu toksiskās ietekmes. Pamatojoties uz iepriekšējām zināšanām par vielu vai tās tuvu analogu, būtu jāapsver papildu astoņu dzīvnieku grupas (pa četriem no katra dzimuma) iekļaušana kontroles un vislielākās devas grupā toksisko ietekmju atgriezeniskuma vai noturības novērošanai laika posmā pēc testa vielas saņemšanas. Šā novērošanas laika posma ilgumu nosaka atbilstīgi novērotajām ietekmēm.

▼B

1.5.2. **Dozēšana**

Izmanto vismaz trīs devu līmeņus un veic vienlaicīgu kontroles eksperimentu, izņemot gadījumu, kad veic pieļaujamā daudzuma testu (skatīt 1.5.3. punktu). Devu līmeņus var noteikt, pamatojoties uz atkārtotās devas vai diapazona atrašanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testa vielu vai radniecīgiem materiāliem. Ja vien lielāko devas līmeni neierobežo testa vielas fizikāli ķīmiskās īpašības vai bioloģiskā ietekme, šis līmenis jāizvēlas ar mērķi izraisīt toksicitāti, bet ne nāvi vai smagas ciešanas. Devu līmeņi samazināšanās secībā jāizvēlas tā, lai parādītu atbildes reakcijas atkarību no devu lielumiem un lai mazākais devas līmenis būtu līmenis, pie kura nav novērojama negatīva ietekme (*NOAEL*). Lai noteiktu intervālus starp devu līmeņiem samazināšanās secībā, bieži optimāli ir izmantot koeficientu 2 līdz 4 un bieži ir labāk pievienot ceturto testa grupu nekā izmantot starp devām ļoti lielus intervālus (piemēram, koeficientu, kas lielāks par 6–10).

Kontroles grupa ir grupa, kas nesaņem testa vielu, vai grupa, kas saņem nesēju, ja testa vielas ievadīšanā izmanto nesēju. Izņemot testa vielu došanu, ar kontroles grupas dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesēju, kontroles grupa saņem lielāko izmantoto nesēja tilpumu. Ja testa vielu ievada ar barību un viela izraisa samazinātu barības uzņemšanu, tad var būt noderīgas kontroles grupas, ko baro pa pāriem, lai izšķirtu, vai samazinājums ir saistīts ar garšas īpašībām vai ar toksikoloģiskajām pārmaiņām testa modelī.

Jāņem vērā šādas nesēja un attiecīgi citu piedevu īpašības: ietekmes uz uzsūkšanos, sadalījumu, vielmaiņu vai testa vielas aizturi; ietekmes uz testa vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; un ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu.

1.5.3. **Pieļaujamā daudzuma tests**

Ja testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, izmantojot šim pētījumam aprakstīto procedūru, nav novērota negatīva ietekme un ja, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām, var pamatoti uzskatīt, ka viela nav toksiska, pilnu pētījumu ar trim devu līmeņiem var uzskatīt par nevajadzīgu. Pieļaujamā daudzuma tests ir izmantojams, izņemot gadījumus, kad vielas iedarbība uz cilvēku norāda, ka jālieto lielāks devas līmenis.

1.5.4. **Devu ievadīšana**

Dzīvniekiem testa vielu dod ik dienu septiņas dienas nedēļā 90 dienu ilgā laika posmā. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ja testa vielu ievada ar zondi, viela ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli dzīvniekiem jāievada vienā devā. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Parasti tilpumam būtu jābūt iespējami mazam. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, testos lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

▼B

Ir svarīgi nodrošināt, lai vielām, kuras ievada ar barību vai dzeramo ūdeni, testā iesaistītās vielas īpašības neizjauktu parasto barības vai ūdens līdzsvaru. Ja testa vielu ievada ar barību, var izmantot nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas) vai nemainīgu devas līmeni, ņemot vērā dzīvnieka ķermeņa svaru; ir jānorāda, kuru alternatīvu izmanto. Vielām, kuras ievada ar zondi vai ar kapsulu, devas jādod vienā laikā katru dienu un pēc vajadzības jāpielāgo, lai saglabātu nemainīgu devas līmeni, ņemot vērā dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja 90 dienu pētījumu veic kā iepriekšēju pētījumu ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījumam, tad tāda pati barība jāizmanto abos pētījumos.

1.5.5. **Novērojumi**

Novērošanas laika posmam būtu jābūt vismaz 90 dienu ilgam. Papildu grupas dzīvnieki, kuri paredzēti tālākai novērošanai, noteiktu laika posmu jātur bez vielas saņemšanas, lai noteiktu toksisko ietekmju noturību vai atveseļošanos no tām.

Jāizdara vispārēji klīniski novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma laika posmu pēc vielas došanas. Jāprotokolē dzīvnieku klīniskais stāvoklis. Vismaz divas reizes dienā, parasti dienas sākumā un beigās, ir jāpārbauda, vai dzīvniekiem neparādās nāves tuvošanās un nāves pazīmes.

Vismaz vienu reizi pirms pirmās pakļaušanas iedarbībai (lai varētu izdarīt salīdzināšanu vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vienu reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojami visiem dzīvniekiem. Šie novērojumi, ja tas ir praktiski izdarāms, būtu jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas krātiņa standartnožogojumā un, vēlams, katru reizi vienā un tajā pašā laikā. Ir jācenšas nodrošināt, lai pārmaiņas novērošanas apstākļos būtu minimālas. Toksicitātes pazīmes rūpīgi jāprotokolē, iekļaujot sākšanās laiku, smagumu un ilgumu. Novērojumos jāiekļauj pārmaiņas ādā, apmatojumā, acīs un gļotādās, sekrēcijas izdalīšanās un veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametrs un neraksturīga elpošana), bet ar to nebūtu jāaprobežojas. Būtu jāprotokolē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz rīkošanos, kā arī klonisko un tonisko kustību klātesamība, pārmaiņas stereotipos (piemēram, pārmērīga kopšanās, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība.

Oftalmoloģiskā apskate, izmantojot oftalmoskopu vai līdzīgu piemērotu ierīci, jāveic pirms testējamās vielas ievadīšanas un pētījuma beigās, vēlams, visiem dzīvniekiem, bet vismaz lielākās devas grupas un kontroles grupas dzīvniekiem. Ja atklāj ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki.

1.5.5.1. *Ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš*

Visi dzīvnieki jānosver vismaz vienu reizi nedēļā. Barības patēriņa mērījumi jāizdara vismaz ik nedēļu. Ja testa vielu ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš arī jāmēra vismaz ik nedēļu. Ūdens patēriņu var ņemt vērā arī barošanas vai mākslīgās barošanas pētījumos, kuru laikā dzeršanas aktivitāte var mainīties.

▼B

1.5.5.2. *Hematoloģija un klīniskā bioķīmija*

Asins paraugi būtu jāņem no noteiktas vietas un vajadzības gadījumā jāglabā piemērotos apstākļos. Testa laika posma beigās paraugus noņem tieši pirms dzīvnieku nogalināšanas procedūras vai kā daļu no tās.

Hematoloģiskās analīzes, iekļaujot hematokrītu, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocitārās formulas, trombocītu skaita un asins recēšanas spējas, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika vai tromboplastīna laika noteikšanu, jāizdara pētījuma sākumā un pēc tam reizi mēnesī vai testa laika posma vidū un, beidzot, testa laika posma beigās.

Klīniskās bioķīmijas analīzes, lai izpētītu galvenās toksiskās ietekmes audos, un jo īpaši ietekmes uz nierēm un aknām, jāizdara asins paraugiem, kas iegūti no visiem dzīvniekiem, testa sākumā un pēc tam reizi mēnesī vai testa laika posma vidū un, beidzot, testa laika posma beigās. Testa jomas, kas būtu jāņem vērā, ir elektrolītu līdzsvars, ogļhidrātu vielmaiņa un aknu un nieru darbība. Konkrēto testu izvēli ietekmēs novērojumi par testa vielas iedarbības veidu. Pirms asins paraugu ņemšanas sugai atbilstīgā laika posmā dzīvniekiem nav jādod barība. Ieteicamās noteikšanas iekļauj kalcija, fosfora, hlorīda jonu, nātrija, kālija, glikozes tukšā dūšā, alanīna aminotransferāzes, aspartāta aminotransferāzes, ornitīna dekarboksilāzes, gamma glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slāpekļa, albumīna, asins kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo serumolbaltumvielu mērījumus.

Urīna analīzes jāizdara vismaz testa sākumā, pēc tam testa laika posma vidū un, beidzot, testa laika posma beigās, savācot urīnu noteiktā laikā. Urīna analīze iekļauj izskata, tilpuma, osmolalitātes vai īpatnējā svara, pH, olbaltumvielu, glikozes un asins/asins šūnu noteikšanu. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novēroto ietekmju izpēti, var izmantot papildu parametrus.

Turklāt būtu jāapsver iespēja veikt pētījumu, kurā izpētītu vispārēju audu bojājumu seruma marķierus. Citas noteikšanas, kas var būt vajadzīgas adekvātai toksikoloģiskai novērtēšanai, iekļauj tauku, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes inhibēšanas analīzes. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novēroto ietekmju izpēti, var izmantot papildu klīniskās bioķīmijas analīzes. Šīs noteikšanas ir jāizdara, ja ķīmiskās vielas pieder dažām klasēm vai katrā konkrētā gadījumā.

Visumā ir vajadzīga elastīga pieeja atkarībā no sugām un novērotām un/vai paredzamām attiecīgās vielas ietekmēm.

1.5.5.3. *Autopsija*

Pētījumā visus dzīvniekus pakļauj pilnai detalizētai autopsijai, kas iekļauj ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobuma, torakālā dobuma, vēdera dobuma un šo dobumu satura rūpīgu apskati. Visu dzīvnieku (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kas atrasti mirstoši un/vai nogalināti pētījuma laikā) aknas ar žultspūsli, nieres, virsnieru dziedzeri, sēklinieki, dzemde, olnīcas, vairogdziedzeris (ar epitēlijķermenīšiem), aizkrūts dziedzeris, liesa, smadzenes un sirds jāatbrīvo no attiecīgajiem apkārtējiem audiem un iespējami drīz pēc secēšanas jānosver, lai izvairītos no izžūšanas.

▼B

Šādi audi jāglabā vispiemērotākajā fiksācijas vidē audu veida izmeklēšanai un paredzētai vēlākai histopatoloģiskai izmeklēšanai: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvi apgabali, iekļaujot lielās smadzenes, smadzenītes un iegarenās smadzenes/smadzeņu tiltu), muguras smadzenes (trijos līmeņos: kakla daļā, torakālajā vidusdaļā un jostasvietas daļā), hipofīze, acis, vairogdziedzeris, epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzeris, barības vads, siekalu dziedzeri, kuņģis, tievās un resnās zarnas (iekļaujot kopu limfātiskos jeb Peijera mezgliņus), aknas, žultspūslis, aizkuņģa dziedzeris, nieres, virsnieru dziedzeri, liesa, sirds, traheja un plaušas, aorta, dzimumdziedzeri, dzemde, akcesorie dzimumorgāni, piena dziedzeri, prostata, urīnpūslis, limfmezgli (vēlams – viens limfmezgls, kas ir uz ievadīšanas ceļa, un otrs, kas ir attālu no ievadīšanas ceļa, lai konstatētu sistēmiskās ietekmes), perifērais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs), vēlams – tiešā muskuļa tuvumā, kaulu smadzeņu izgriezums (un/vai svaigu kaulu smadzeņu aspirāts) un āda. Klīnisko un citu novērojumu dēļ var rasties doma papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko uzskata par iespējamiem mērķa orgāniem, pamatojoties uz zināmām testa vielas īpašībām.

1.5.5.4. *Histopatoloģija*

Vismaz visu kontroles grupas un lielākās devas grupas dzīvnieku konservētajiem orgāniem un audiem jāizdara pilna histopatoloģiska izmeklēšana. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas, minētās izmeklēšanas jāpaplašina uz visu citu dozēšanas grupu dzīvniekiem.

Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi.

Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, kuros ietekmes konstatētas vielu saņemušajām grupām.

2. DATI UN TO NOFORMĒŠANA

2.1. DATI

Jāsniedz dati par katru atsevišķu dzīvnieku. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, katrai testa grupai parādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, dzīvnieku skaitu, kas testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nogalināti, un katras nobeigšanās vai humānas nogalināšanas laiku, dzīvnieku skaitu, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, iekļaujot toksisko ietekmju sākuma laiku, ilgumu un smagumu, dzīvnieku skaitu, kam novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo daudzumu, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi.

Attiecīgā gadījumā skaitliskie rezultāti būtu jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistisko metodi. Statistiskās metodes un analizējamie dati būtu jāizvēlas, plānojot pētījumu.

2.2. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

▼B

2.2.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis, tīrība un fizikāli ķīmiskās īpašības,

— identificēšanas dati,

— nesējs (attiecīgā gadījumā): nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

2.2.2. **Testa suga:**

— izmantotā suga un līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

2.2.3. **Testa apstākļi:**

— devu izvēles pamatojums,

— sīks apraksts par testa vielas sagatavošanu/pievienošanu barībai, iegūto sagatavotā maisījuma koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— sīks testa vielas ievadīšanas apraksts,

— testa vielas faktiskās devas (mg/kg ķermeņa masas dienā) un – attiecīgā gadījumā – koeficients, lai testa vielas koncentrāciju (milj. daļās) barībā/dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajās devās,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti.

2.2.4. **Rezultāti:**

— ķermeņa svars/ķermeņa svara pārmaiņas,

— attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,

— dati par toksisko iedarbību pēc dzimuma un devu līmeņa, iekļaujot toksicitātes pazīmes,

— klīnisko novērojumu būtība, smagums un ilgums (vai tie ir vai nav atgriezeniski),

— oftalmoloģiskās izmeklēšanas dati,

— hematoloģisko testu dati ar attiecīgajiem normas robežu lielumiem,

— klīniskās bioķīmijas testu dati ar attiecīgajiem normas robežu lielumiem,

— ķermeņa beigu svars, orgānu svars un orgānu/ķermeņa svara attiecība,

— autopsijas rezultāti,

— sīki izstrādāts visu histopatoloģijas rezultātu apraksts,

— dati par absorbciju, ja pieejami,

— attiecīgā gadījumā – statistiskās apstrādes rezultāti.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

▼B

B.28. **SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC ĀRĪGAS APLIKĀCIJAS – ATKĀRTOTA ĀRĪGA APLIKĀCIJA GRAUZĒJIEM (90 DIENAS)**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. METODES BŪTĪBA

Pārbaudāmo vielu dažādās devās katru dienu 90 dienu laikā uztriepj uz ādas izmēģinājumu dzīvniekiem, kas sadalīti vairākās grupās, un vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Aplikācijas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Dzīvniekus, kas miruši izmēģinājuma laikā, secē un, beidzoties izmēģinājumam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. **Sagatavošanas darbi**

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Neilgi pirms izmēģinājuma dzīvniekiem uz muguras nocērp apmatojumu. Ādu var arī noskūt, bet tas jādara 24 stundas pirms izmēģinājuma. Parasti ik pēc nedēļas cirpšanu vai skūšanu atkārto. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu. Pārbaudāmās vielas aplikācijai jāsagatavo ne mazāk kā 10 % no ķermeņa virsmas. Lemjot par to, cik lielai ādas virsmai jābūt brīvai no apmatojuma, lai to apstrādātu ar vielu, ņem vērā dzīvnieku svaru. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, pārbaudāmā viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu šķīdinātāju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Šķidrumus parasti pārbauda neatšķaidītā vaidā. Parasti aplikāciju veic vienreiz dienā piecas līdz septiņas dienas nedēļā.

1.6.2. **Testa apstākļi**

1.6.2.1. Izmēģinājumu dzīvnieki

Var izmantot pieaugušas žurkas, trušus vai jūrascūciņas. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet tad šī izvēle ir jāpamato. Uzsākot izmēģinājumu, svara svārstību diapazonam jābūt ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes testu, izmantojot ārīgu aplikāciju, veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas un līnijas dzīvnieki.

▼B

1.6.2.2. Dzīvnieku skaits un dzimums

Vienu un to pašu devu izmēģina vismaz uz 20 (10 sieviešu un 10 vīriešu kārtas) dzīvniekiem ar veselu ādu. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā. Bez tam var izveidot papildu grupu no 20 dzīvniekiem (pa 10 no katra dzimuma), kas 90 dienas saņem lielāko devu, un 28 dienu laikā pēc aplikācijas novēro, vai toksiskie simptomi ir atgriezeniski, noturīgi vai novēloti.

1.6.2.3. Izmantotās devas

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, kā arī jābūt kontroles grupai un, ja lieto šķīdinātāju, jābūt vēl vienai kontroles grupai, kurā dzīvnieki saņem tikai šķīdinātāju. Ekspozīcijas laiks ir vismaz sešas stundas dienā. Pārbaudāmās vielas aplikāciju katru dienu veic vienādā laikā, un vajadzīgais vielas daudzums ik pa laikam jāpielāgo (ik pēc nedēļas vai divām nedēļām), lai tās deva būtu nemainīga attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru. Ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem pārbaudāmo vielu. Ja izmanto šķīdinātāju, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu šķīdinātāja kā dzīvnieki, kas saņem lielāko vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst būt toksiska. Ja ir pieejami aptuveni dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. To dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski izvērtēt rezultātus.

Ja pārbaudāmās vielas aplikācija izraisa smagu ādas iekaisumu, tās koncentrācija jāsamazina, un tādēļ var samazināties vai neizpausties citi toksicitātes simptomi, lietojot lielo devu. Ja ādai ir nopietni bojājumi, var gadīties, ka izmēģinājums ir jāpārtrauc, un jauna pārbaude jāveic ar mazāku koncentrāciju.

1.6.3. **Novērošanas periods**

Ja sākotnējā pārbaudē izmanto 1 000 mg/kg devu vai pat lielāku devu, kas atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki (ja tā ir zināma), un tai nenovēro toksisku iedarbību, var uzskatīt, ka turpmāka testēšana nav nepieciešama.

1.6.4. **Novērošanas periods**

Izmēģinājumu dzīvniekiem katru dienu pārbauda toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi, kā arī laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

▼B

1.6.5. **Testa norise**

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Dzīvniekus parasti apstrādā ar pārbaudāmo vielu 7 dienas nedēļā 90 dienu laikā.

Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzētas tālākai novērošanai, turpmākās 28 dienas nesaņem pārbaudāmo vielu, lai varētu izsekot, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība. Ekspozīcijas ilgums ir vismaz 6 stundas dienā.

Pārbaudāmā viela vienmērīgi jāuztriepj uz ādas virsmas, kas veido aptuveni 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamo ādas virsmu var samazināt, bet tai vienalga jābūt pēc iespējas lielākai, un viela jāuztriepj cik iespējams plānāk un vienmērīgāk.

Pārbaudāmās vielas saskari ar ādu ekspozīcijas laikā nodrošina ar poraina marles pārsēja un nekairinoša plākstera palīdzību. Apstrādātā vieta vēl papildus pienācīgi jāpārklāj, lai nostiprinātu marles pārsēju ar pārbaudāmo vielu un lai dzīvnieki nevarētu norīt pārbaudāmo vielu. Lai pārbaudāmā viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nebūtu vēlama.

Beidzoties ekspozīcijas laikam, pārbaudāmās vielas atlikums no ādas jānoņem, ja iespējams, izmantojot ūdeni vai citu piemērotu ādas mazgāšanas līdzekli.

Dzīvniekus katru dienu novēro, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš, un katru nedēļu dzīvnieki jānosver. Pastāvīga dzīvnieku novērošana ļauj novērst dzīvnieku zudumus izmēģinājuma laikā kanibālisma, audu autolīzes vai nepareizu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visus dzīvniekus, tostarp arī kontroles dzīvniekus, parasti pakļauj šādām pārbaudēm:

a) pirms pārbaudāmās vielas aplikācijas un testa beigās jāveic ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas ir saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja novēro izmaiņas acīs, ir jāpārbauda visi dzīvnieki;

b) beidzoties izmēģinājumam, jāveic hematoloģiskā izmeklēšana, kas ietver hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocītu formulas, kā arī asins recēšanas spēju, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika, tromboplastīna laika vai trombocītu skaita noteikšanu;

▼B

c) beidzoties izmēģinājumam, jāveic arī asins klīniskās bioķīmijas izmeklējumi. Šie izmeklējumi visos gadījumos attiecas uz elektrolītu sastāvu, ogļhidrātu metabolismu, aknu un nieru darbību. Atsevišķu analīžu izvēle ir atkarīga no konkrētās vielas iedarbības veida. Ieteiktās analīzes ietver kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, glikozes pēc badošanās (badošanās ilgums ir atkarīgs no dzīvnieku sugas), seruma glutamātpiruvāttransamināzes ([1]), seruma glutamātoksalacetāttransamināzes ([2]), ornitīndekarboksilāzes, gamma-glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slāpekļa, albumīna, plazmas kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma olbaltumvielu noteikšanu. Citas analīzes, kas jāveic, lai gūtu vispusīgu toksikoloģisko novērtējumu, paredz lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu. Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu vielas iedarbību;

d) urīnanalīze parasti nav jāveic, ja vien nepastāv varbūtība, ka viela var būt toksiska, vai to apstiprina novērojumi.

Ja agrāk iegūtie dati ir nepietiekami, pirms uzsākt izmēģinājumu, jāapsver iespēja jau iepriekš noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas rādītājus.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem veic pilnu autopsiju, kas paredz ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru, kā arī galvaskausa, krūškurvja un vēdera dobuma un to satura apskati. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes, ieskaitot iegarenās smadzenes/tiltu, smadzenīšu garozu un smadzeņu garozu, hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, (traheja), plaušas, sirds, aorta, siekalu dziedzeri, aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde, papildu dzimumorgāni, žultspūslis (ja ir), barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, (sievišķais piena dziedzeris), (augšstilba muskulatūra), perifērās nervu sistēmas nervi, (acis), (krūšu kauls ar kaula smadzenēm), (augšstilba kauls ar locītavas virsmu), (triju līmeņu muguras smadzenes – no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona) un (ārpusorbītas asaru dziedzeri). Iekavās iekļautie audi jāpārbauda tikai tad, ja novēro toksiskuma pazīmes vai viela iedarbojas tieši uz šo orgānu.

Histopatoloģiskā izmeklēšana

a) Vispusīgu normālas un apstrādātas ādas, orgānu un audu histopatoloģisko izmeklēšanu veic visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem, kas ir saņēmuši lielāko devu.

b) Jāizpēta visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem.

([1]) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
([2]) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartāmaminotransferāze.

▼B

c) Jāizpēta iedarbības skartie orgāni arī pārējās dzīvnieku grupās.

d) Ja izmanto žurkas, histopatoloģiski jāizmeklē infekcijas klātbūtne dzīvnieku plaušās pēc mazās un vidēji lielās devas aplikācijas, jo šādi var ērti novērtēt dzīvnieku veselības stāvokli. Turpmāko histopatoloģisko izmeklēšanu šajās dzīvnieku grupās parasti neveic, bet to obligāti veic dzīvniekiem pēc lielās devas aplikācijas, un tā attiecas uz orgāniem, kuriem ir novēroti bojājumi.

e) Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiski jāizmeklē audi un orgāni, uz kuriem iedarbojas pārbaudāmā viela pēc aplikācijas pārējās grupās.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti bojājumi, bojājumu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katru bojājuma tipu. Iegūtie rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi,

— izmantotās devas (jānorāda arī šķīdinātājs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— toksiskās reakcijas atkarībā no dzimuma un devas,

— netoksiska deva, ja var noteikt,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— oftalmoloģijas dati,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),

— autopsijas rezultāti,

▼B

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

▼M4

B.29. **SUBHRONISKĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 90 DIENU PĒTĪJUMS**

KOPSAVILKUMS

Šī B.29. pārskatītā testēšanas metode ir izstrādāta, lai pilnībā raksturotu testējamās ķīmiskās vielas inhalācijas toksicitāti pēc subhroniska perioda (90 dienas) un lai nodrošinātu uzticamus datus kvantitatīviem inhalācijas riska novērtējumiem. Desmit tēviņu un 10 mātīšu grauzēju grupas sešas stundas dienā 90 dienas (13 nedēļas) tiek pakļautas a) testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai trīs vai vairākos koncentrācijas līmeņos; b) filtrēta gaisa (negatīva kontrole) iedarbībai; un/vai c) nesējvielas iedarbībai (nesējvielas kontrole). Dzīvniekus iedarbībai parasti pakļauj piecas dienas nedēļā, bet ir atļauta arī ekspozīcija septiņas dienas nedēļā. Testā vienmēr ietver gan tēviņus, gan mātītes, bet tos var pakļaut dažādiem koncentrācijas līmeņiem, ja ir zināms, ka viens dzimums pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks. Šī metode pētījuma vadītājam nodrošina iespēju, lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, paredzēt satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas), dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, bronhoalveolāru lavāžu (*BAL*), neiroloģiskos testus un papildu klīniski patoloģiskos un histopatoloģiskos izvērtējumus.

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 413 (2009. gads). Subhroniskai inhalācijas toksicitātei veltīto Testēšanas norādījumu 413 (*TG 413*) sākotnējā versija tika pieņemta 1981. gadā (1). Šī B.29. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga pārskatītajiem *TG 413* (2009. gads)) ir atjaunināta, lai atspoguļotu zinātniskos atklājumus un lai nodrošinātu atbilstību pašreizējām un turpmākām regulatīvajām vajadzībām.

2. Subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumus galvenokārt izmanto, lai izstrādātu regulatīvas koncentrācijas un novērtētu darba ņēmēju risku darba vidē. Tos arī izmanto, lai novērtētu risku, kam cilvēki ir pakļauti mājās, transportā, kā arī vides risku. Šī metode ļauj raksturot nelabvēlīgo ietekmi pēc katru dienu atkārtotas inhalatīvas ekspozīcijas testējamajai ķīmiskajai vielai 90 dienu laikā (apmēram 10 % no žurkas mūža). Datus, ko iegūst šādos subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumos, var izmantot kvantitatīvajiem riska novērtējumiem un koncentrāciju izvēlei hroniskās toksicitātes pētījumiem. Šī testēšanas metode nav īpaši paredzēta nanomateriālu testēšanai. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 39 (*GD 39*) (2).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs izvēlēties piemērotas testa koncentrācijas, var ietvert testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; kā arī datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Ja tiek paredzēta vai pētījuma gaitā tiek novērota neirotoksicitāte, pētījuma vadītājs var izvēlēties ietvert attiecīgu izvērtēšanu, piemēram, funkcionālu novērojumu sēriju (*FOB*) un motoriskās aktivitātes mērījumus. Lai gan ekspozīciju laika pieskaņošanai konkrētiem izmeklējumiem var būt izšķiroša nozīme, šo papilddarbību īstenošana nedrīkst traucēt pamatpētījuma plānam.

▼M4

4. Kairinošu vai kodīgu testējamo ķīmisko vielu atšķaidījumus var testēt koncentrācijās, kas nodrošinās vajadzīgo toksicitātes pakāpi. Papildu informāciju sk. *GD 39* (2). Pakļaujot dzīvniekus šo materiālu iedarbībai, mērķkoncentrācijām jābūt pietiekami zemām, lai neradītu izteiktas sāpes un ciešanas, tomēr tām jābūt pietiekamām, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līknes pagarinātu līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, vēlams, pamatojoties uz attiecīgi izplānotu diapazona noteikšanas pētījumu, kas sniedz informāciju par kritisko beigupunktu, kairinājuma slieksni un ietekmes sākumu (sk. 11.–13. punktu). Izraudzītās koncentrācijas jāpamato.

5. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē. Mirstošos dzīvniekus ņem vērā tāpat kā testa laikā mirušos dzīvniekus. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

6. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši grauzēji, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Dienā, kad veic nejaušinātu izvēli, dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem dzīvniekiem (7–9 nedēļu vecumā). Ķermeņa svaram jābūt ± 20 % no katra dzimuma vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus ņem nejaušināti, marķē individuālai identificēšanai un līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Dzīvnieku turēšana

8. Dzīvniekus ir vēlams individuāli identificēt, ieteicams, ar zemādas retranslatoriem, lai atvieglotu novērojumu veikšanu un izvairītos no pārpratumiem. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam ir jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

▼M4

Inhalācijas kameras

9. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas veids un testa priekšmets. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmienu principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti *GD 39* (2).

TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI

Robežkoncentrācijas

10. Pretēji akūtās toksicitātes pētījumiem subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumiem nav noteiktu robežkoncentrāciju. Nosakot maksimālās testa koncentrācijas, jāņem vērā: 1) maksimālā sasniedzamā koncentrācija; 2) cilvēka ekspozīcijas līmeņa "sliktākais scenārijs"; 3) nepieciešamība saglabāt pietiekamu skābekļa padevi; un/vai 4) dzīvnieku labturības apsvērumi. Ja nav pieejami ar datiem pamatoti ierobežojumi, var izmantot Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (13) noteiktās akūtās toksicitātes robežkoncentrācijas (t. i., līdz maksimālajai koncentrācijai 5 mg/l aerosoliem, 20 mg/l tvaikiem un 20 000 ppm gāzēm) (sk. *GD 39* (2)). Ja, testējot gāzes vai ļoti gaistošas testējamās ķīmiskās vielas (piemēram, aukstumaģentus), ir nepieciešams pārsniegt šīs robežkoncentrācijas, tas jāpamato. Robežkoncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).

Diapazona noteikšanas pētījums

11. Pirms galvenā pētījuma sākšanas parasti ir nepieciešams veikt diapazona noteikšanas pētījumu. Diapazona noteikšanas pētījums ir vispusīgāks par devu diapazona pētījumu, jo tas neattiecas tikai uz koncentrāciju izvēli. Diapazona noteikšanas pētījumā iegūtās zināšanas var palīdzēt sekmīgi īstenot galveno pētījumu. Piemēram, diapazona noteikšanas pētījuma rezultātā var iegūt tehnisku informāciju par analītiskajām metodēm, daļiņu lieluma noteikšanu un toksisku mehānismu atklāšanu, klīniskās patoloģijas un histopatoloģijas datus, kā arī aplēses par to, kādas varētu būt galvenā pētījuma *NOAEL* un *MTC* koncentrācijas. Pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot diapazona noteikšanas pētījumu, lai noteiktu elpošanas sistēmas kairinājuma slieksni (piemēram, ar elpošanas sistēmas histopatoloģiju, plaušu funkcijas testēšanu vai bronhoalveolāru lavāžu), augstāko koncentrāciju, kas ir panesama, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu, un parametrus, kuri vislabāk raksturos testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu.

12. Diapazona noteikšanas pētījumā var aplūkot vienu vai vairākus koncentrācijas līmeņus. Atkarībā no izraudzītajiem beigupunktiem katra koncentrācijas līmeņa iedarbībai jāpakļauj 3–6 tēviņi un 3–6 mātītes. Diapazona noteikšanas pētījumam jāilgst vismaz piecas dienas un parasti ne vairāk kā 28 dienas. Pētījuma ziņojumā tas jāpamato galvenā pētījuma koncentrāciju izvēlei. Galvenā pētījuma mērķis ir parādīt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, pamatojoties uz prognozēto jutīgāko beigupunktu. Par zemāko koncentrāciju ieteicams izvēlēties koncentrāciju, kuras gadījumā nav novērojama nelabvēlīga ietekme, savukārt augstākajai koncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).

▼M4

13. Izvēloties koncentrācijas līmeņus diapazona noteikšanas pētījumam, jāņem vērā visa pieejamā informācija, tostarp struktūras un aktivitātes sakarības un dati par līdzīgām ķīmiskajām vielām (sk. 3. punktu). Diapazona noteikšanas pētījumā var verificēt/atspēkot viedokļus par jutīgākajiem mehāniskajiem beigupunktiem, tādiem kā holīnesterāzes inhibēšana ar organofosfātiem, methemoglobīna veidošana ar eritrocītiem toksiskiem preparātiem, vairogdziedzerim toksisku vielu ietekme uz vairogdziedzera hormoniem (T_3, T_4), bronhoalveolārā lavāžā konstatētas olbaltumvielas, *LDH* vai neitrofīli attiecībā uz inertām mazšķīstošām daļiņām vai plaušas kairinošiem aerosoliem.

Galvenais pētījums

14. Subhroniskās toksicitātes galvenais pētījums parasti aptver trīs koncentrācijas līmeņus, kā arī pēc vajadzības vienlaicīgas negatīvas (gaisa) un/vai nesējvielas kontroles (sk. 18. punktu). Izvēloties attiecīgus ekspozīcijas līmeņus, ir jāizmanto visi pieejamie dati, tostarp sistēmiskās toksicitātes pētījumu, metabolisma un kinētikas rezultāti (īpaši jācenšas izvairīties no augstiem koncentrācijas līmeņiem, kas piesātina kinētiskos procesus). Katrā testa grupā ir 10 grauzēju tēviņi un 10 grauzēju mātītes, ko pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai sešas stundas dienā piecas dienas nedēļā 13 nedēļas pēc kārtas (kopējais pētījuma ilgums ir vismaz 90 dienas). Dzīvniekus var iedarbībai pakļaut arī septiņas dienas nedēļā (piemēram, testējot ieelpojamus farmaceitiskos preparātus). Ja ir zināms, ka kāds no dzimumiem pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks, dzimumus var pakļaut dažādu koncentrācijas līmeņu iedarbībai, lai optimizētu koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, kā aprakstīts 15. punktā. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja ekspozīcijas ilgums dienā ir mazāks par sešām stundām vai ja ir jāveic liela ilguma (piemēram, 22 stundas dienā) visa ķermeņa ekspozīcijas pētījums, tas jāpamato (sk. *GD 39*) (2). Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot, ja vien ekspozīcija neilgst vairāk par sešām stundām. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.

15. Ar izraudzītajām mērķkoncentrācijām ir jānoskaidro mērķorgāns(-i) un jāparāda skaidra koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarība:

— augstākajam koncentrācijas līmenim ir jāizraisa toksiska ietekme, bet tas nedrīkst radīt ilgstošas pazīmes vai mirstību, kuras dēļ nebūtu iespējama lietderīga izvērtēšana,

— vidējiem koncentrācijas līmeņiem ir jābūt pakāpeniskiem, lai nodrošinātu pakāpenisku toksisko ietekmi starp zemākās un augstākās koncentrācijas iedarbību,

— zemākajā koncentrācijas līmenī toksicitātei ir jāizpaužas maz vai vispār nav jāizpaužas.

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā

16. Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, dzīvnieku skaits katram ekspozīcijas līmenim ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus līdz pētījuma beigām plānots nonāvēt. Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā jāpamato, un šie dzīvnieki pienācīgi jāatspoguļo statistikas analīzēs.

▼M4

Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījums

17. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījumu var izmantot, lai novērotu toksicitātes atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos attiecīgā laikā (bet ne mazāk kā 14 dienas) pēc vielas ievadīšanas. Satelītgrupās (atgriezeniskuma grupās) ir 10 tēviņi un 10 mātītes, ko vienlaikus ar galvenā pētījuma eksperimentālajiem dzīvniekiem pakļauj ekspozīcijai. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) ir jāpakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai augstākajā koncentrācijas līmenī, kā arī pēc vajadzības līdztekus jāveic gaisa un/vai nesējvielas kontrole (sk. 18. punktu).

Kontroldzīvnieki

18. Ar līdztekus veiktajā negatīvajā (gaisa) kontrolē izmantotajiem dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem, izņemot to, ka tos pakļauj filtrēta gaisa, nevis testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto ūdeni vai citu vielu, pētījumā negatīvas (gaisa) kontroles grupas vietā ir jāizmanto nesējvielas kontroles grupa. Kad vien iespējams, par nesējvielu ir jāizmanto ūdens. Ja par nesējvielu izmanto ūdeni, kontroldzīvniekus pakļauj tāda gaisa iedarbībai, kura relatīvais mitrums atbilst ekspozīcijas gaisa mitrumam. Piemērota nesējviela jāizvēlas, balstoties uz pienācīgi veiktu priekšizpēti vai vēsturiskiem datiem. Ja nesējvielas toksiskums nav droši zināms, pētījuma vadītājs dažkārt izvēlas izmantot gan negatīvas (gaisa) kontroles grupu, gan nesējvielas kontroles grupu, bet tas nekādā ziņā nav ieteicams. Ja vēsturiskie dati norāda, ka nesējviela nav toksiska, negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav nepieciešama un ir jāizmanto vienīgi nesējvielas kontroles grupa. Ja kādā nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas priekšizpētē toksicitāti neatklāj, secina, ka šī nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska, un kontrolgrupai jāizmanto tieši šī nesējviela.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

19. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītajām koncentrācijām un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas. Lai samazinātu daļiņu lielumu, to materiālus var pakļaut mehāniskiem procesiem. Papildu norādījumi ir sniegti *GD 39* (2).

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

20. Daļiņu lieluma noteikšana jāveic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (*MMAD*) diapazonā no 1 līdz 3 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3 (4). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas būs mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas un šķiedrmateriāli šo standartu var pārsniegt.

▼M4

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

21. Testu ar testējamo ķīmisko vielu ir vēlams veikt bez nesējvielas. Ja ir nepieciešams izmantot nesējvielu, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu, priekšroka dodama ūdenim. Ja testējamo ķīmisko vielu izšķīdina nesējvielā, ir jāpierāda tās stabilitāte.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU UZRAUDZĪBA

Gaisa plūsma caur kameru

22. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur ekspozīcijas kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai laiciskās stabilitātes) reāllaika monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos inhalācijas parametrus. Ja koncentrācija tiek uzraudzīta reāllaikā, gaisa plūsmu mērījumu biežumu var samazināt līdz vienam mērījumam katrā ekspozīcijas dienā. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana. Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šim standartam, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra. Ja pirmās dienas mērījumi parāda, ka šo gāzu līmeņi ir attiecīgi, turpmāki mērījumi nav vajadzīgi.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

23. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir nepārtraukti jāmonitorē un jāreģistrē reizi stundā katras ekspozīcijas laikā, kad tas ir iespējams. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

24. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko dala ar inhalācijas kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

25. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteikta dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu

▼M4

pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka ar izraudzīto metodi tikušas ievāktas visas fāzes.

26. Ja iespējams, visa pētījuma laikā jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)

27. Ekspozīcijas atmosfēra ir jāuztur iespējami nemainīga. Lai pierādītu ekspozīcijas apstākļu stabilitāti, var izmantot reāllaika monitoringa ierīci, piemēram, aerosolu fotometru aerosoliem vai kopējo ogļūdeņražu analizatoru tvaikiem. Faktiskā koncentrācija kamerā ir jāmēra vismaz trīs reizes katrā ekspozīcijas dienā katram ekspozīcijas līmenim. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, var pietikt ar vienu paraugu katras ekspozīcijas laikā. Vēlams šo paraugu ievākt visu ekspozīcijas laiku. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem un ± 20 % šķidriem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst visam laikam, kad testējamā ķīmiskā viela tiek ģenerēta. Tajā ieskaita laiku, kas vajadzīgs, lai kamerā sasniegtu līdzsvara stāvokli (t_{95}) un koncentrācijas samazināšanos. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti *GD 39* (2).

28. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi. Tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir galvenā aktīvā sastāvdaļa maisījumā. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai indikatorvielai (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama *GD 39* (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

29. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz reizi nedēļā katram koncentrācijas līmenim, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju (*APS*). Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā.

▼M4

30. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsitējs / gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. *GD 39* (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā visu testēto koncentrāciju gadījumā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecinošu datu ieguvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot pētījumu.

31. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību.

NOVĒROJUMI

32. Dzīvnieki ir klīniski jānovēro pirms un pēc ekspozīcijas perioda, kā arī tā laikā. Atkarībā no dzīvnieku atbildes reakcijas ekspozīcijas laikā var noteikt biežākus novērojumus. Ja dzīvnieku novērošanu traucē dzīvnieku fiksācijas cauruļu izmantošana, vāji apgaismotas visa ķermeņa ekspozīcijas kameras vai neizgaismota atmosfēra, dzīvnieki ir uzmanīgi jānovēro pēc ekspozīcijas. Novērojumos pirms nākamās dienas ekspozīcijas var novērtēt toksiskās ietekmes atgriezeniskumu vai saasināšanos.

33. Visus novērojumus reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

34. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites un nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu. Pētījuma protokolā var ietvert papildu novērtējumus, piemēram, par kinētiku, biomonitoringu, plaušu funkciju, aizturētiem mazšķīstošiem materiāliem, kas uzkrājas plaušu audos, un uzvedības maiņām.

ĶERMEŅA SVARS

35. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē drīz pēc pirmās ekspozīcijas (0. diena), pēc tam divreiz nedēļā (piemēram, piektdienās un pirmdienās, lai parādītu atveseļošanos nedēļas nogalē, kurā nenotiek ekspozīcija, vai ar laika intervāliem, kas ļauj novērtēt sistēmisko toksicitāti) un nāves iestāšanās vai eitanāzijas brīdī. Ja pirmo 4 nedēļu laikā netiek novērota nekāda ietekme, pārējā pētījuma laikā ķermeņa svaru var noteikt reizi nedēļā. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekus (ja tos izmanto) ir jāturpina svērt reizi nedēļā visā atveseļošanās periodā. Beidzot pētījumu, visi dzīvnieki neilgi pirms nonāvēšanas ir jānosver, lai nodrošinātu orgānu un ķermeņa svara attiecību objektīvu aprēķinu.

BARĪBAS UN ŪDENS PATĒRIŅŠ

36. Barības patēriņš ir jānosaka reizi nedēļā. Var noteikt arī ūdens patēriņu.

▼M4

KLĪNISKĀ PATOLOĢIJA

37. Klīniskās patoloģijas novērtējumi ir jāveic visiem dzīvniekiem, arī kontroles un satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekiem, kad šos dzīvniekus nonāvē. Jāreģistrē laika intervāls starp ekspozīcijas beigām un asins parauga ņemšanu, it sevišķi, ja attiecīgais beigupunkts strauji atjaunojas. Parametriem ar īsu pussabrukšanas periodu plazmā (piemēram, *COHb*, *CHE* un *MetHb*) ir ieteicama paraugu ņemšana pēc ekspozīcijas pabeigšanas.

38. Turpmāk 1. tabulā ir uzskaitīti klīniskās patoloģijas parametri, kas parasti ir vajadzīgi visiem toksikoloģijas pētījumiem. Urīnanalīze parasti nav jāveic, bet to var veikt, ja to uzskata par lietderīgu, jo tiek prognozēta vai novērota toksicitāte. Lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, pētījuma vadītājs var izvēlēties novērtēt papildu parametrus (piemēram, holīnesterāzi, lipīdus, hormonus, skābju/bāzu līdzsvaru, methemoglobīnu vai Heinca ķermenīšus, kreatīnkināzi, mieloīdu/eritroīdu attiecību, troponīnus, arteriālo asiņu gāzes, laktātdehidrogenāzi, sorbitāldehidrogenāzi, glutamātdehidrogenāzi un gamma glutamiltranspeptidāzi).

1. tabula

Klīniskās patoloģijas standartparametri

Hematoloģija	
Eritrocītu skaits	Kopējais leikocītu skaits
Hematokrīts	Diferenciālais leikocītu skaits
Hemoglobīna koncentrācija	Trombocītu skaits
Vidējais korpuskulārais hemoglobīns	Asins recētspēja (izvēlieties vienu):
Vidējais korpuskulārais tilpums	— protrombīna laiks
Vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija	— recēšanas laiks
Retikulocīti	— daļējais tromboplastīna laiks
Klīniskā ķīmija	
Glikoze (*)	Alanīna aminotransferāze
Kopējais holesterīns	Aspartāta aminotransferāze
Triglicerīdi	Alkalīnfosfatāze
Asins urīnvielas slāpeklis	Kālijs
Kopējais bilirubīns	Nātrijs
Kreatinīns	Kalcijs
Kopējais olbaltums	Fosfors
Albumīns	Hlorīds
Globulīns	
Urīnanalīze (pēc izvēles)	
Izskats (krāsa un duļķainība)	Kopējais olbaltums
Tilpums	Glikoze
Īpatnējais svars vai osmolalitāte	Asinis / asins šūnas
pH	

(*) Tā kā ilgstošs nebarošanas periods var apdraudēt testa dzīvnieku glikozes mērījumu objektivitāti salīdzinājumā ar kontroldzīvnieku glikozes mērījumiem, pētījuma vadītājam ir jānosaka, vai dzīvnieku nebarošana ir piemērota pieeja. Ja tiek izmantots nebarošanas periods, tam ir jābūt piemērotam izmantotajām sugām. Žurkai tas varētu būt 16 stundas (nebarošana uz nakti). Glikozi tukšā dūšā var noteikt pēc nakts nebarošanas perioda pēdējā ekspozīcijas nedēļā vai pēc nakts nebarošanas perioda pirms autopsijas (ja to nosaka pirms autopsijas, tas jādara kopā ar visiem pārējiem klīniskās patoloģijas parametriem).

▼**M4**

39. Ja pastāv liecības, ka galvenā nogulsnēšanās un aiztures vieta ir elpošanas sistēmas lejasdaļa (t. i., alveolas), bronhoalveolāra lavāža (*BAL*) var būt piemērots paņēmiens, ar ko kvantitatīvi analizēt uz hipotēzi pamatotus devas un ietekmes parametrus, koncentrējot uzmanību uz alveolītu, plaušu iekaisumu un fosfolipidozi. Tas ļauj attiecīgi analizēt atbildes reakciju uz devu un alveolāro bojājumu pārmaiņas laika gaitā. *BAL* šķidrumu var analizēt, lai noteiktu leikocītu kopējo un diferenciālo skaitu, kopējo olbaltumu un laktātdehidrogenāzi. Vēl var aplūkot parametrus, kas liecina par lizosomu bojājumiem, fosfolipidozi, fibrozi un kairinošu vai alerģisku iekaisumu, sakarā ar kuru var noteikt arī iekaisuma reakciju veicinātājus citokīnus/hemokīnus. *BAL* mērījumi parasti papildina histopatoloģijas izmeklējumu rezultātus, bet nevar tos aizstāt. Norādījumi par plaušu lavāžas veikšanu pieejami *GD 39* (2).

OFTALMOLOĢISKĀ IZMEKLĒŠANA

40. Ar oftalmoskopu vai līdzvērtīgu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas, kā arī visām augstu koncentrāciju grupām un kontrolgrupām, pētījumu pabeidzot, ir jāveic acs dibena, acs optiskā aparāta, varavīksnenes un konjunktīvas oftalmoloģiskā izmeklēšana. Ja tiek konstatētas pārmaiņas acīs, jāizmeklē visi dzīvnieki pārējās grupās, tostarp satelītgrupā (atgriezeniskuma grupā).

SMAGA PATOLOĢIJA UN ORGĀNU SVARS

41. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kas dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna atasiņošana (ja iespējams) un pilna autopsija. Ir jāreģistrē laiks starp katra dzīvnieka pēdējās ekspozīcijas beigām un eitanāziju. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsija jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādām elpošanas sistēmas pārmaiņām.

42. Turpmāk 2. tabulā ir uzskaitīti orgāni un audi, kas pilnās autopsijas laikā ir jāuzglabā piemērotā līdzeklī histopatoloģisko izmeklējumu veikšanai. Lēmums par [iekavās] norādīto orgānu un audu uzglabāšanu, kā arī jebkādu citu orgānu un audu uzglabāšanu ir pētījuma vadītāja ziņā. **Treknrakstā** uzskaitītie orgāni ir jāatbrīvo no audiem un jānosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Vairogdziedzeris un sēklinieku piedēkļi jānosver tikai tādā gadījumā, ja tas vajadzīgs, jo atbrīvošana no artefaktiem var traucēt histopatoloģisko izvērtēšanu. Audu un orgānu fiksācija ir jāveic 10 % bufervielas formalīnā vai citā piemērotā fiksācijas šķīdumā tūlīt pēc autopsijas un ne mazāk kā 24–48 stundas pirms atbrīvošanas no audiem atkarībā no izmantotā fiksācijas šķīduma.

▼M4

2. tabula

Orgāni un audi, ko saglabā pilnas autopsijas laikā

Virsnieru dziedzeri	Barības vads
Aorta	[Ožas sīpols]
Kaulu smadzenes (un/vai svaigs aspirāts)	**Olnīcas**
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Aizkuņģa dziedzeris
Aklā zarna	Epitēlijķermenīši
Lokzarna	Perifērais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs, vēlams, muskuļa tuvumā)
Divpadsmitpirkstu zarna	Hipofīze
[**Sēklinieku piedēkļi**]	Prostata
[Acis (tīklene, acs nervs) un plakstiņi]	Taisnā zarna
Augšstilbs un pakaļkājas ceļa locītava	Siekalu dziedzeri
Žultspūslis (ja ir)	Sēklas pūslīši
[Hardera dziedzeri]	Āda
Sirds	Muguras smadzenes (kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)
Līkumainā zarna	**Liesa**
Tukšā zarna	Krūšu kauls
Nieres	Kuņģis
[Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)]	Zobi
Balsene (trīs līmeņi, ieskaitot uzgāmura pamatni)	**Sēklinieki**
Aknas	**Tīms**
Plauša (visas daivas vienā līmenī ar galvenajiem bronhiem)	**Vairogdziedzeris**
Plaušas vārtu limfmezgli, sevišķi testējamām ķīmiskām vielām no mazšķīstošām daļiņām. Padziļinātiem izmeklējumiem un/vai pētījumiem, kuros uzmanība pievērsta imunoloģiskajiem aspektiem, var apsvērt, vai neņemt papildu limfmezglus, piemēram, limfmezglus no mediastinālā, kakla/zemžokļu un/vai aurikulārā apvidus.	[Mēle]
Limfmezgli (distālie no vārtiem)	Traheja (vismaz divi līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķērsgriezumu)
Piena dziedzeris (sievišķais)	[Urīnvads]
Muskulis (augšstilba)	[Urīnizvadkanāls]
Aizdegunes audi (vismaz četri līmeņi; viens līmenis, kurā ietilpst aizdegunes kanāls un ar degunu saistītie limfātiskās sistēmas audi (*NALT*)).	Urīnpūslis
	Dzemde
	Mērķorgāni
	Visi makroskopiskie bojājumi un masas rādījumi

▼M4

43. Lai saglabātu plaušu struktūru, plaušas jāizņem neskartas, jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksācijas šķīdumu spiedienā, ko rada 20–30 cm dziļš ūdens (5). Visu daivu, arī galveno bronhu, izgriezumi jāievāc vienā līmenī, bet, ja veic plaušu lavāžu, neskalotā daiva ir jāizgriež trijos līmeņos (tās nedrīkst būt sēriju sekcijas).

44. Aizdegunes audi ir jāizmeklē vismaz četros līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver aizdegunes kanāls (5) (6) (7) (8) (9), lai varētu pienācīgi izmeklēt plakano epitēliju, pārejas epitēliju (elpceļu bezskropstiņepitēliju), elpceļu epitēliju (elpceļu skropstiņepitēliju) un ožas epitēliju, un drenējošos limfātiskos audus (*NALT*) (10) (11). Balsene ir jāizmeklē trijos līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver uzgāmura pamatne (12). Ir jāizmeklē vismaz divi trahejas līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķērsgriezumu.

HISTOPATOLOĢIJA

45. Visu 2. tabulā uzskaitīto orgānu un audu histopatoloģiska izvērtēšana jāizdara kontrolgrupai, augstākās koncentrācijas grupai, kā arī visiem dzīvniekiem, kas nobeidzas vai tiek nonāvēti pētījuma laikā. Īpaša uzmanība ir jāpievērš elpošanas sistēmai, mērķorgāniem un makroskopiskiem bojājumiem. Tie orgāni un audi, kuriem augstākās koncentrācijas grupā ir novēroti bojājumi, ir jāizmeklē visām grupām. Lai pierādītu nepārprotamu atbildes reakciju uz koncentrāciju, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt histopatoloģisku izvērtēšanu papildu grupām. Ja izmanto satelītgrupu (atgriezeniskuma grupu), histopatoloģiska izvērtēšana ir jāizdara visiem audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme. Ja augstākās koncentrācijas grupā ir novērots pārmērīgi daudz agrīnas nobeigšanās gadījumu vai citas problēmas, kas mazina datu būtiskumu, ir histopatoloģiski jāizmeklē nākamā zemāka koncentrācijas līmeņa grupa. Jāmēģina rast korelāciju starp pilnas autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

46. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka ķermeņa svaru, barības patēriņu, klīnisko patoloģiju, smagu patoloģiju, orgānu svaru un histopatoloģiju. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kuri izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi. Gan kvantitatīvie, gan papildu rezultāti ir jānovērtē ar attiecīgu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

— apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,

▼M4

— izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka. Var norādīt avotu un vēsturiskos datus, ja tie ir par dzīvniekiem, kas pakļauti tādai pašai ekspozīcijai, turēšanas apstākļiem un nebarošanas periodiem,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— nejaušināšanas metode,

— jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),

— identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (*CAS*), ja zināms.

Nesējviela:

— nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),

— vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

— inhalācijas kameras sīks apraksts, ieskaitot tilpumu un shēmu,

— dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,

— temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,

— kondicionēšanai izmantotai gaisa avots un sistēma,

— metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,

— spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),

— ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta kamerā (visa ķermeņa ekspozīcija),

— testa atmosfēras stabilitāte,

— temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,

— pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde,

— gaisa caurplūduma rādītāji, gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniekslodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),

— laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),

— tilpuma nomaiņu skaits stundā,

— mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

— pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,

▼M4

— nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,

— visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (mg/l, mg/m^3 utt.), nevis tilpuma vienībās (ppm, ppb utt.),

— daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (*MMAD*) un ģeometriskā standartnovirze (σ_g), tostarp to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķas daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai,

— apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ko izmanto, lai ģenerētu testa atmosfēru un dzīvniekus pakļautu tās iedarbībai,

— apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai uzraudzītu kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu (t. i., kalibrēšanas līknes attīstība),

— apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai paņemtu paraugus nolūkā noteikt koncentrāciju kamerā un daļiņu sadalījumu pēc lieluma,

— sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),

— nejaušināšanas metode, ar kādu dzīvniekus iedala testa un kontroles grupās,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),

— testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

— tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,

— tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,

— tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un *MMAD* un σ_g aprēķinus,

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),

▼M4

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka svaru,

— tabula ar datiem par barības patēriņu,

— tabula ar klīniskās patoloģijas datiem,

— katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

— īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,

— ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,

— pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,

— jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs),

— jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,

— jānorāda mērķorgāns(-i),

— jānosaka *NOAEL* un *LOAEL*.

LITERATŪRA

(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. gads). 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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006, OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.

▼**M4**

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

B.30. **HRONISKĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas (ESAO) Testēšanas norādījumiem 452 (*TG*) (2009. gads). Sākotnējos *TG* 452 pieņēma 1981. gadā. Šīs pārskatītās B.30. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (1) (2) (3) (4). Šīs B.30. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.32. nodaļas "Kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai un šā pielikuma B.33. nodaļas "Apvienotie hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai.

2. Lielāko daļu hroniskās toksicitātes pētījumu veic ar grauzēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav grauzēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šajā testēšanas metodē noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (5), kā noteikts ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (6).

3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto hroniskās toksicitātes pētījumos, ir orālais ceļš, ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība pievērsta orālajam ceļam, kas ir hroniskās toksicitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēku veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījumi ar ārīgas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādus pētījumus plāno individuāli, lai gan šeit izklāstīto testēšanas metodi hroniskās toksicitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai ārīgas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu inhalācijas (6) (7) un ārīgas aplikācijas ceļā (6). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (8) un B.29. nodaļa (9), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (7). Ja veic testus ar ārīgu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (10).

▼**M4**

5. Hroniskās toksicitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai, kura ilgst būtisku izmantoto sugu mūža daļu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, kā arī norādīs mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var arī iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērta arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.

6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo pētījumu mērķi ir citu starpā šādi:

— noteikt testējamās ķīmiskās vielas hronisko toksicitāti,

— noteikt mērķorgānus,

— raksturot devas un atbildes reakcijas sakarību,

— noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (*NOAEL*), vai etalondevas (*BMD*) noteikšanas sākumpunktu,

— prognozēt hroniskās toksicitātes ietekmi līmeņos, kādos paredzama cilvēka ekspozīcija,

— sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (6).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz efektīvāku hroniskās toksicitātes potenciāla testēšanu un lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas toksiskās īpašības, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu informāciju par iedarbības veidu; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas, kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami) un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Hroniskās toksicitātes noteikšana jāveic tikai pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa sastāvdaļu jāuzskata arī hroniskās toksicitātes testēšana ar vairākposmu pieeju (11) (12) (13) (14).

8. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākoriģē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analīzēm un galvenās atsauces uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (15).

▼M4

9. Veicot hroniskās toksicitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (16), it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: *"Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvnieks uzrāda klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem informēts lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."*

10. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (17) (18). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski situācijā, kad ir jāveic apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums (šā pielikuma B.33. nodaļa) (11. punkts).

11. Jāapsver arī iespēja veikt apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šī B.30. testēšanas metode) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.32. nodaļa). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazeminātа datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (9. un 20.–25. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi.

12. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

TESTA PRINCIPS

13. Testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām eksperimentālo dzīvnieku grupām, parasti 12 mēnešus, lai gan var izraudzīties arī garākus vai īsākus periodus atkarībā no regulatīvajām prasībām (sk. 33. punktu). Izvēlas periodu, kas ir pietiekami ilgs, lai jebkāda kumulatīvas toksicitātes ietekme kļūtu pamanāma bez geriatrisku pārmaiņu maldinošajām sekām. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli, lai gan var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai ārīgu aplikāciju. Pētījuma plāns var ietvert arī vienu vai vairākas dzīvnieku nonāvēšanas testa laikā, piemēram, trešajā un sestajā mēnesī, un var tikt ietvertas papildu dzīvnieku grupas, lai šim apstāklim pielāgotos (sk. 19. punktu). Vielas ievadīšanas laikā rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kuri testa laikā nobeidzas vai kurus tā laikā nonāvē, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

▼M4

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

14. Šī testēšanas metode galvenokārt attiecas uz hroniskās toksicitātes novērtēšanu un izvērtēšanu grauzējos (sk. 2. punktu), lai gan tiek atzīts, ka daži tiesiskā regulējuma režīmi var prasīt tādus pašus pētījumus ar sugām, kas nav grauzēji. Sugu izvēle ir jāpamato. Ja jāveic hroniskās toksicitātes pētījumi ar sugām, kas nav grauzēji, šie pētījumi jāplāno un jāīsteno, balstoties uz principiem, kuri izklāstīti šajā testēšanas metodē, kā arī šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (5). Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

15. Šajā testēšanas metodē ieteicamā suga ir žurka, lai gan var izmantot arī citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Žurkas un peles ir bijuši ieteicamie eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm īpašībām, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Ir jāizmanto jauni, veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Hroniskās toksicitātes pētījums jāveic ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os). Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Turēšanas un barošanas apstākļi

16. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (19) (20) (21). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un tādu uztura piesārņotāju, arī pesticīdu atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsagatavo un galaziņojumā jāietver analītiska informācija par uzturvielu un uztura piesārņojuma līmeņiem. Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība nodrošināt gan piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukumu, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

17. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc zīdīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara

▼M4

atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katra dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

18. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai pētījuma beigās katrā grupā būtu pieejams pietiekami daudz dzīvnieku rūpīgas bioloģiskas un statistiskas izvērtēšanas veikšanai. Grauzēju gadījumā katrā grupā jāizmanto vismaz 20 katra dzimuma dzīvnieki katram devas līmenim, savukārt tādu dzīvnieku gadījumā, kas nav grauzēji, katrā grupā ieteicams izmantot vismaz četriem katra dzimuma dzīvniekus. Pētījumos ar pelēm var būt nepieciešami papildu dzīvnieki katras devas grupā, lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus.

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītgrupas un indikatordzīvnieki

19. Lai iegūtu informāciju par toksikoloģisko pārmaiņu norisi un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā (vismaz 10 dzīvnieki no katra dzimuma katrā grupā), piemēram, sestajā mēnesī. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. Var ietvert arī satelītgrupas, lai pārraudzītu jebkādu pētītās testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu; šīs grupas parasti nodrošina tikai pētījuma augstākajam devas līmenim un kontrolgrupai. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikatordzīvnieku grupu (parasti 5 dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārraudzītu slimības stāvokli (22). Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana testa laikā vai satelītgrupu vai indikatorgrupu izmantošana, pētījuma plānā paredzētais dzīvnieku skaits ir jāpalielina par to skaitu, ko plānots nonāvēt pirms pētījuma beigām. Šiem dzīvniekiem parasti ir jāveic tādi paši novērojumi – tostarp jānovēro ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš, jāveic hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mērījumi, kā arī patoloģiskie izmeklējumi – kā dzīvniekiem galvenā pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, lai gan var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte.

Devu grupas un dozējums

20. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6). Jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi, un jānodrošina paralēla kontrole, izņemot gadījumu, ja veic pieļaujamā daudzuma testu (sk. 27. punktu). Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotas devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai radniecīgajām ķīmiskajām vielām.

▼M4

21. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas ar nolūku noskaidrot galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagas toksicitāti, saslimstību un mirstību. Vienlaikus ņemot vērā turpmāk 22. punktā izklāstītos faktorus, augstākais devas līmenis ir jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %).

22. Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru. Augstākais devas līmenis nedrīkstētu pārsniegt 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā (robeždeva; sk. 27. punktu).

23. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tādus, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un *NOAEL* vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, *BMD* (sk. 25. punktu) zemākā devas līmeņa gadījumā. No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds slieksnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai.

24. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli, un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.

25. Kā plašāk izklāstīts Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:

— devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,

— toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtām devām,

— jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,

— iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,

— devas un atbildes reakcijas sakarības līknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās *BMD* vai prognozētā sliekšņa diapazonā,

— apsvērumi par paredzamajiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem.

▼M4

26. Kontrolgrupa ir vielu nesaņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās tā patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

27. Ja, pamatojoties uz provizoriskos pētījumos iegūto informāciju, var prognozēt, ka testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izmantojot šim pētījumam aprakstītās procedūras, netiks novērota nelabvēlīga ietekme, un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām, var uzskatīt, ka viela nebūs toksiska, pilnu pētījumu ar trīs devu līmeņiem var atzīt par nevajadzīgu. Var piemērot ierobežojumu 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izņemot gadījumu, ja cilvēka ekspozīcija liecina, ka jāizmanto augstāks devas līmenis.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

28. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tādus preparātus, attiecībā uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmiens pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceitiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, arī pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažos gadījumos, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.

29. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.

30. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgtermiņa toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar uzturu, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.

▼M4

31. Orālas ievadīšanas gadījumā dzīvniekiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā), parasti 12 mēnešus (sk. arī 33. punktu), lai gan var būt vajadzīgs ilgāks periods atkarībā no regulatīvajām prasībām. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (10), un tas ilgst 12 mēnešus. Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecas dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 12 mēneši. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu sugai raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (8).

32. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā dalītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un grauzējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (22). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatšķaida, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

33. Lai gan šī testēšanas metode pirmām kārtām ir paredzēta kā 12 mēnešu hroniskās testēšanas pētījums, pētījuma plāns pieļauj (un to var izmantot, lai veiktu) īsākus (piemēram, 6 vai 9 mēnešu) vai garākus (piemēram, 18 vai 24 mēnešu) pētījumus atkarībā no konkrētu tiesisko regulējumu prasībām vai konkrētiem mehānistiskiem mērķiem. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Satelītgrupas, kas ir ietvertas, lai uzraudzītu jebkādu testā ietvertās testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, vismaz 4 nedēļas un ne ilgāk kā vienu trešdaļu kopējā pētījuma laika pēc ekspozīcijas pārtraukšanas ir jātur bez devu ievadīšanas. Papildu norādījumi, tostarp apsvērumi par izdzīvošanu pētījumā, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

NOVĒROJUMI

34. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma periodu pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota mākslīgā barošana.

▼M4

35. Visiem dzīvniekiem vismaz vienreiz pirms pirmās ekspozīcijas (lai vienam un tam pašam dzīvniekam varētu izdarīt salīdzināšanu), pētījuma pirmās nedēļas beigās un reizi mēnesī pēc tam ir jāveic detalizēti klīniskie novērojumi. Novērojumu protokols ir jāparedz tāds, lai iespējami samazinātos variācijas starp atsevišķiem novērotājiem un lai tās nebūtu atkarīgas no testa grupas. Šie novērojumi ir jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, standartnožogojumā un visos gadījumos vienos un tajos pašos laikos. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai novērošanas apstākļu variācijas būtu minimālas. Protokolējamās pazīmēs cita starpā jāiekļauj ādas, apmatojuma, acu, gļotādas, sekrēcijas un izdalījumu, kā arī veģetatīvās aktivitātes pārmaiņas (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas un nerakstūrīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (24).

36. Ar oftalmoskopu vai citu piemērotu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas pirmās ievadīšanas ir jāveic oftalmoloģiska izmeklēšana. Pētījuma beigās šo izmeklēšanu ieteicams veikt visiem dzīvniekiem vai vismaz dzīvniekiem lielāko devu un kontroles grupās. Ja atklāj ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki. Ja strukturāla analīze vai cita informācija liecina par toksicitāti acīs, jāpalielina acu izmeklēšanas biežums.

37. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt neirotoksisku ietekmi, var pēc izvēles novērtēt to izraisītās sensoriskās reakcijas uz dažāda veida kairinājumiem (24) (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinājumiem) (25) (26) (27), satveršanas stiprumu (28) un motorisko aktivitāti (29), pirms sāk pētījumu, kā arī ik pa trijiem mēnešiem pēc pētījuma sākšanas līdz 12 mēnešiem (ieskaitot) un arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot arī alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.

38. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt imūntoksisku ietekmi, pētījuma beigās šo beigupunktu var pēc izvēles izmeklēt vēl papildus.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

39. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

▼M4

Hematoloģija un klīniskā bioķīmija

40. Pētījumos ar grauzējiem hematoloģiskie izmeklējumi ir jāveic vismaz 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā trešajā, sestajā un divpadsmitajā mēnesī, kā arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem), visu laiku izmantojot vienus un tos pašus dzīvniekus. Lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus pelēm (sk. 18. punktu), var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja hematoloģiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītas vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot.

41. Jāizmeklē šādi parametri (30): leikocītu kopējais un diferenciālais skaits, eritrocītu skaits, trombocītu skaits, hemoglobīna koncentrācija, hematokrīts (hematokrīta skaitlis), vidējais korpuskulārais tilpums (*MCV*), vidējais korpuskulārais hemoglobīns (*MCH*), vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija (*MCHC*), protrombīna laiks un aktivizētais daļējais tromboplastīna laiks. Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus hematoloģijas parametrus, piemēram, Heinca ķermenīšus vai citus netipiskas morfoloģijas eritrocītus, vai methemoglobīnu. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes. Ja testējamā ķīmiskā viela ietekmē hematopoētisko sistēmu, var norādīt arī retikulocītu skaitu un kaulu smadzeņu citoloģiju, lai gan šie mērījumi parasti nav jāveic.

42. Asins paraugiem, kas iegūti vismaz no 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā ar tādiem pašiem laika intervāliem, kā norādīts hematoloģiskajiem izmeklējumiem, visu laiku izmantojot vienus un tos pašus dzīvniekus, ir jāveic klīniski bioķīmiskie izmeklējumi, lai noteiktu būtisku toksisku ietekmi audos un tieši ietekmi uz nierēm un aknām. Lai varētu veikt visus vajadzīgos klīniski bioķīmiskos izmeklējumus pelēm, var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja klīniski bioķīmiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ir ieteicams dzīvniekiem (izņemot peles) pirms asins paraugu ņemšanas uz nakti nedot barību. Jāizmeklē šādi parametri (30): glikoze, urīnviela (urīnvielas slāpeklis), kreatinīns, kopējais olbaltums, albumīns, kalcijs, nātrijs, kālijs, kopējais holesterīns, vismaz divi attiecīgi hepatocelulārās izvērtēšanas testi (alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, glutamātdehidrogenāze, kopējās žultskābes) (31), kā arī vismaz divi attiecīgi hepatobiliāro novērtējumu testi (alkalīnfosfatāze, gamma glutamiltransferāze, 5'-nukleotidāze, kopējais bilirubīns, kopējās žultskābes) (31). Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus klīniski bioķīmiskos parametrus, piemēram, triglicerīdus (tukšā dūšā), konkrētus hormonus un holīnesterāzi. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes.

▼M4

43. Urīnanalīzes ir jāveic vismaz 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā, izmantojot paraugus, kas ievākti ar tādiem pašiem intervāliem kā hematoloģiskām un klīniski bioķīmiskām analīzēm. Mērījumi trešajā mēnesī nav jāveic, ja urīnanalīze nav uzrādījusi nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ekspertu ieteikumā par klīniskās patoloģijas pētījumiem norādīti šādi parametri (30): izskats, tilpums, osmolaritāte vai īpatnējais svars, pH, kopējais olbaltums un glikoze. No citiem mērījumiem jāmin ketons, urobilinogēns, bilirubīns un slēptās asinis. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novērotās ietekmes izpēti, var izmantot papildu parametrus.

44. Parasti tiek uzskatīts, ka pētījumos ar suņiem pirms vielas ievadīšanas ir vajadzīgi hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mainīgie izejlielumi, bet pētījumos ar grauzējiem tie nav jānosaka (30). Tomēr, ja vēsturiskie izejdati (sk. 50. punktu) ir nepietiekami, jāapsver iespēja šādus datus iegūt.

Patoloģija

Pilna autopsija

45. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem parasti veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Tomēr var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā, vai satelītgrupām), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte (sk. 19. punktu). Šiem dzīvniekiem nav jāveic autopsija un sekojošajos punktos aprakstītās turpmākās procedūras. Indikatordzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs).

46. Orgānu svars ir jānosaka visiem dzīvniekiem, izņemot tos, kas ir izslēgti saskaņā ar 45. punkta pēdējo daļu. Visu dzīvnieku (izņemot dzīvniekus, kas atrasti mirstoši un/vai ir nonāvēti pētījuma laikā) virsnieru dziedzeri, smadzenes, sēklinieku piedēkļi, sirds, nieres, aknas, olnīcas, liesa, sēklinieki, vairogdziedzeris (nosvērts pēc fiksācijas kopā ar epitēlijķermenīšiem) un dzemde ir pēc vajadzības jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic natīvais svars. Pētījumā ar pelēm virsnieru dziedzeru svēršana nav obligāta.

47. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (32) (kvadrātiekavās norādītie audi nav obligāti) ir jāsaglabā turpmāk sarakstā norādītie audi.

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemdes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]

▼M4

Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemdes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranazālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezums un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārīgu aplikāciju ir jāsaglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (8) un B.29. nodaļas (9) ieteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālo ievadīšanu.

Histopatoloģija

48. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (32). Ir jāizdara vismaz šādi histopatoloģiskie izmeklējumi:

— visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,

— visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,

— visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas,

— mērķaudi vai audi, kas uzrāda ar ievadīšanu saistītas pārmaiņas lielākās devas grupā, no visiem dzīvniekiem visu pārējo devu grupās,

— pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

▼M4

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

49. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam izpaužas toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.

50. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralēlajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.

51. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (8. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.

Testēšanas pārskats

52. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati,

— ķīmiskās vielas izcelsme,

— sērijas numurs,

— ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,

▼M4

— izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

— ievadīšanas ceļa un devu izvēles pamatojums,

— attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu,

— analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas ceļš un sīka informācija par ievadīšanu,

— inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajā devā,

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati):

— izdzīvošanas dati,

— ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,

— barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,

— dati par toksisko atbildes reakciju pēc dzimuma un devu līmeņa, ieskaitot toksicitātes pazīmes,

— klīniski novērotas ietekmes veids, biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums), kā arī ilgums (pārejoša vai pastāvīga),

— oftalmoloģiskā izmeklēšana,

— hematoloģiskie izmeklējumi,

— klīniski bioķīmiskie izmeklējumi,

— urīnanalīzes izmeklējumi,

— jebkādu neirotoksicitātes vai imūntoksicitātes izmeklējumu rezultāti,

— ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,

— orgānu svars (un to attiecības, ja vajadzīgs),

— autopsijas atrade,

— visu ar ievadīšanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts,

— dati par absorbciju, ja pieejami.

▼**M4**

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Rezultātu interpretācija un komentāri, arī:

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,

— modelēšanas pieeju iztirzājums,

— *BMD*, NOAEL vai *LOAEL* noteikšana,

— vēsturiskie kontroldati,

— būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".

(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 N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".

(9) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".

(10) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".

(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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).

(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. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼B

B.31. **PRENATĀLĀS ONTOĢENĒZES TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO 414. (2001) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Šī ontoģenēzes toksicitātes testa metode ir paredzēta, lai sniegtu vispārīgo informāciju par pirmsdzemdību iedarbības ietekmi uz grūsnu testa dzīvnieku un uz attīstošos organismu *in utero*; tā var iekļaut vērtējumu par iedarbību uz māti, kā arī par augļa nāvi, strukturālajām anomālijām vai augšanas izmaiņām. Funkcionāli bojājumi, kaut arī tie ir svarīga attīstības daļa, nav šīs testa metodes sastāvdaļa. Tos var testēt atsevišķā pētījumā vai kā papildinājumu šim pētījumam, izmantojot attīstības neirotoksicitātes testa metodi. Informācija par funkcionālu bojājumu un citu postnatālo iedarbību testa metodi attiecīgi skatīt divu paaudžu reproduktīvās toksicitātes un attīstības neirotoksicitātes pētījumu testa metodē.

Šai testa metodei atsevišķos gadījumos var būt vajadzīga īpaša pielāgošana, pamatojoties uz konkrētām zināšanām, piemēram, par testējamās vielas fizikāli ķīmiskajām vai toksikoloģiskajām īpašībām. Tāda pielāgošana ir pieņemama, ja pārliecinoši zinātniski dati liecina, ka pielāgojumi testu padarīs informatīvāku. Tādā gadījumā pētījuma pārskatā minētie zinātniskie dati ir rūpīgi jādokumentē.

1.2. DEFINĪCIJAS

Ontoģenēzes toksikoloģija: pētījums par tādām blakusparādībām uz attīstošos organismu, kuras var izraisīt iedarbība pirms apaugļošanas, prenatālās attīstības laikā vai postnatāli līdz seksuālās nobriešanas laikam. Galvenās ontoģenēzes toksicitātes izpausmes iekļauj: 1) organisma nāvi, 2) strukturālas anomālijas, 3) izmainītu augšanu un 4) funkcionālus bojājumus. Ontoģenēzes toksikoloģiju agrāk bieži minēja kā teratoloģiju.

Kaitīga iedarbība: jebkura ar vielas ievadīšanu saistīta tāda izmaiņa pret bāzes līniju, kas samazina organisma spēju izdzīvot, vairoties vai pielāgoties videi. Kas attiecas uz ontoģenēzes toksikoloģiju plašākajā nozīmē, tā iekļauj visas iedarbības, kas traucē normālu apaugļošanas produkta attīstību gan pirms dzimšanas, gan pēc tās.

Izmainīta augšana: pēcnācēja orgāna vai ķermeņa svara vai lieluma izmaiņas.

Izmaiņas (anomālijas): attīstības strukturālas izmaiņas, kas iekļauj malformācijas un novirzes (28).

Malformācija/ievērojama anomālija: strukturāla izmaiņa, ko uzskata par dzīvniekam kaitīgu (var būt arī letāla) un kas parasti ir reti sastopama.

▼B

Novirze/neliela anomālija: strukturāla izmaiņa, ko uzskata par tādu, kam nav kaitīga iedarbība uz dzīvnieku; var būt pārejoša un kontroles populācijā var būt relatīvi bieži sastopama.

Apaugļošanas produkts: apaugļotas olšūnas atvasinājumu summa jebkurā attīstības pakāpē no apaugļošanas līdz dzimšanai, iekļaujot augļapvalkus, kā arī embriju vai augli.

Implantācija (nidācija): blastocistas piestiprināšanās dzemdes epiteliālajam izklājumam, iekļaujot tās iziešanu caur dzemdes epitēliju un implantāciju endometrijā.

Embrijs: organisma agrīnais vai attīstības posms, jo īpaši olšūnas apaugļošanās produkts, kas attīstās, pēc tam, kad parādījusies garenvirziena ass, un līdz laikam, kad izveidojušās visas galvenās struktūras.

Embriotoksicitāte: kaitīga embrija normālajai struktūrai, attīstībai, augšanai un/vai dzīvotspējai.

Auglis: nedzimis pēcnācējs pēcembrija laika posmā.

Fetotoksicitāte: kaitīga augļa normālajai struktūrai, attīstībai, augšanai un/vai dzīvotspējai.

Aborts: priekšlaicīga apaugļošanās produktu – embrija vai dzīvotnespējīga augļa – izgrūšana no dzemdes.

Resorbcija: apaugļošanas produkts, kas implantēts dzemdē, pēc tam miris un tiek resorbēts vai ir resorbēts.

Agrīna resorbcija: implantācijas pierādījumi bez identificējama embrija/augļa.

Vēla resorbcija: miris embrijs vai auglis ar ārējām deģeneratīvām izmaiņām.

NOAEL: saīsinājums no "nenovēro nelabvēlīgu ietekmes līmeni" (*NOAEL*) (līmenis, pie kura nav novērojama nevēlama ietekme), un tas ir lielākais devas vai iedarbības līmenis, pie kura nav novērojami ar vielas ievadīšanu saistīti nevēlami rezultāti.

1.3. STANDARTVIELA

Nav.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Parasti testējamo vielu ievada grūsniem dzīvniekiem vismaz pēc implantācijas līdz vienai dienai pirms plānotās nogalināšanas, kurai jābūt iespējami tuvu parastajai dzemdību dienai, neriskējot zaudēt datus priekšlaicīgu dzemdību dēļ. Testa metode nav paredzēta, lai apskatītu tikai organoģenēzes posmu (piemēram, no 5. līdz 15. dienai grauzējiem un no 6. līdz 18. dienai trušiem), bet attiecīgā gadījumā arī iedarbību no preimplantācijas visā grūsnības periodā līdz dienai pirms ķeizargrieziena. Īsi pirms ķeizargrieziena mātītes nogalina, apskata dzemdes saturu un augļus novērtē attiecībā uz ārēji redzamām anomālijām un mīksto audu un skeleta izmaiņām.

▼B

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Ir ieteicams testēšanu izdarīt ar visatbilstošākajām sugām un tādām laboratorijas sugām un līnijām, ko parasti izmanto ontoģenēzes toksicitātes prenatālā testēšanā. Piemērotākā grauzēju suga ir žurka un piemērotākā suga, kas nav grauzēji, ir trusis. Ja izmanto citas sugas, jāsniedz pamatojums.

1.5.2. **Turēšanas un barošanas nosacījumi**

Eksperimentālo dzīvnieku telpā temperatūrai jābūt 22 °C (± 3°) žurkām un 18 °C (± 3°) trušiem. Lai gan, izņemot telpas tīrīšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams, lai tas nepārsniegtu 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Attiecībā uz barošanu var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Priekšroka dodama sapāroto dzīvnieku atsevišķai turēšanai, pieņemama ir arī turēšana nelielās grupās.

1.5.3. **Dzīvnieku sagatavošana**

Jāizmanto veseli dzīvnieki, kas ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz piecas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas izmēģinājumu procedūras. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, dzimumu, svaru un/vai vecumu. Visiem dzīvniekiem vai testa grupām, cik vien tas praktiski iespējams, jābūt vienāda svara un vecuma. Pie katra devas līmeņa jāizmanto jauni negrūsni pieauguši sievišķā dzimuma dzīvnieki. Sievišķā dzimuma dzīvnieki jāpāro ar tās pašas sugas un līnijas vīrišķā dzimuma dzīvniekiem un ir jāizvairās no brāļu un māsu pārošanas. Žurkām grūsnības 0. diena ir diena, kad novērots vagīnas embols un/vai sperma; trušiem grūsnības 0. diena ir diena, kad noticis *coitus* vai mākslīgā apsēklošana, ja lieto minēto metodi. Sapārotie sievišķā dzimuma dzīvnieki pēc nejaušas izvēles jāiedala kontroles un vielas došanas grupā. Būri jāizvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Katram dzīvniekam piešķir unikālu identifikācijas numuru. Pārotie sievišķā dzimuma dzīvnieki pēc nejaušās izvēles jāiedala kontroles un vielas došanas grupā, un, ja sievišķā dzimuma dzīvnieki ir pāroti partijās, dzīvnieki ir vienmērīgi jāsadala katras partijas grupās. Līdzīgi vienmērīgās grupās ir jāsadala sievišķā dzimuma dzīvnieki, ko apsēklojis viens un tas pats vīrišķā dzimuma dzīvnieks.

1.6. PROCEDŪRA

1.6.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katrā testa un kontroles grupā jābūt pietiekamam sievišķā dzimuma dzīvnieku skaitam, lai autopsijā būtu aptuveni 20 sievišķā dzimuma dzīvnieki ar implantācijas vietām. Grupas ar mazāk nekā 16 dzīvniekiem ar implantācijas vietām var būt neatbilstošas. Māšu mirstība obligāti nepadara pētījumu nederīgu ar nosacījumu, ka tā nepārsniedz aptuveni 10 %.

▼B

1.6.2. **Devu sagatavošana**

Ja dozēšanas atvieglošanai izmanto nesēju vai citu piedevu, jāņem vērā šādas īpašības – iedarbība uz testējamās vielas uzsūkšanos, sadalījumu, metabolismu un aizturi vai izdalīšanos; iedarbība uz testējamās vielas ķīmiskajām īpašībām, kas var mainīt tās toksiskās īpašības; iedarbība uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojuma stāvokli. Nesējs nedrīkst būt toksisks ontoģenēzē vai ietekmēt reproduktīvo funkciju.

1.6.3. **Dozēšana**

Parasti testējamo vielu ievada katru dienu no implantācijas (piemēram, piektajā dienā pēc pārošanas) līdz dienai, kas ir dienu pirms plānotā ķeizargrieziena. Ja pieejamie iepriekšējie pētījumi nenorāda uz augstu pirmsimplantācijas zudumu iespēju, vielas ievadīšanu var paildzināt, iekļaujot visu grūsnības periodu no pārošanas līdz dienai pirms plānotās nogalināšanas. Ir labi zināms, ka grūsnības laikā nepiemērota apiešanās vai stress var izraisīt prenatālus zudumus. Lai pasargātos no prenatāliem zudumiem, ko izraisa ar vielas ievadīšanu nesaistīti faktori, ir jāizvairās no nevajadzīgas rīkošanās ar grūsniem dzīvniekiem, kā arī no ārējo faktoru radīta stresa, piemēram, trokšņa.

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un jāpielieto vienlaicīga grupu kontrole. Veseli dzīvnieki pēc nejaušās izvēles jāiedala kontroles un vielas ievadīšanas grupā. Devu līmeņi jāizvieto tā, lai veidotos toksisko iedarbību gradācija. Ja testējamās vielas fizikālās/ķīmiskās īpašības vai bioloģiskās īpašības nav ierobežotas, lielākā deva jāizvēlas, lai izraisītu nelielu ontoģenēzes toksicitāti un/vai māšu toksicitāti (klīniskās pazīmes vai ķermeņa svara samazinājums), bet ne nāvi vai smagas ciešanas. Vismaz vienam vidēji lielās devas līmenim jāizraisa minimālā novērojamā toksiskā iedarbība. Vielas mazākā deva nedrīkst izraisīt mātes toksicitātes vai ontoģenēzes toksicitātes pazīmes. Devu līmeņi lejupejošā secībā jāizvēlas tā, lai parādītu visas ar dozēšanu saistītās atbildes reakcijas un nenovērotas nelabvēlīgas ietekmes līmeni (*NOAEL*). Lejupejošo devu līmeņu uzdošanai bieži optimāli ir divkārši līdz četrkārši starplaiki, un ceturtās testa grupas pievienošana bieži ir ieteicamāka par ļoti plašu (piemēram, vairāk par 10 reizēm) starplaiku izmantošanu starp dozēšanām. Kaut arī mērķis ir mātes *NOAEL* noteikšana, var būt pieņemami arī pētījumi, kas šādu līmeni nenosaka (1).

Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā esošos toksicitātes datus, kā arī papildu informāciju par testējamo vielu un ar to saistīto materiālu metabolismu un toksikokinētiku. Tāda informācija arī palīdzēs parādīt dozēšanas režīma atbilstību.

Jāizmanto vienlaicīgas kontroles grupa. Šai grupai jābūt placebo saņēmējai kontroles grupai vai nesēja kontroles grupai, ja testējamās vielas došanā izmanto nesēju. Visām grupām jādod tas pats testējamās vielas vai nesēja tilpums. Ar kontroles grupas(-u) dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem. Nesēja kontroles grupai nesējs jāsaņem lielākajā izmantotajā daudzumā (kā zemākajā vielas saņemšanas grupā).

▼B

1.6.4. **Pieļaujamības tests**

Ja testā pie viena devas līmeņa, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, ievadot perorāli un izmantojot šim pētījumam aprakstītās procedūras, nav izraisīta novērojama toksicitāte ne grūsnajiem dzīvniekiem, ne to pēcnācējiem un ja iedarbība nav sagaidāma, pamatojoties uz esošajiem datiem (piemēram, no struktūras ziņā un/vai metaboliski radniecīgiem savienojumiem), tad pilnu pētījumu ar trīs devu līmeņu izmantošanu nevar uzskatīt par vajadzīgu. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka pieļaujamības testā jāizmanto lielāks perorālās devas līmenis. Citiem ievadīšanas veidiem, tādiem kā ieelpošana un pielietošana uz ādas, vielas fizikāli ķīmiskās īpašības bieži var norādīt un ierobežot maksimālo sasniedzamo iedarbības līmeni (piemēram, pielietošana uz ādas nedrīkstētu izraisīt smagu lokālu toksicitāti).

1.6.5. **Devu ievadīšana**

Testējamo vielu vai nesēju parasti ievada perorāli vai caur zondi. Ja izmanto citu ievadīšanas veidu, testa izpildītājam jāsniedz tā izvēles pamatojums un izskaidrojums, un var būt vajadzīgi attiecīgi grozījumi (2) (3) (4). Testējamo vielu katru dienu ievada aptuveni vienā laikā.

Atsevišķo dzīvnieku devām parasti jābūt pamatotām uz atsevišķo ķermeņa svaru jaunāko noteikšanu. Tomēr jābūt piesardzīgiem, pielāgojot devu grūsnības pēdējās trešdaļas laikā. Lai novērstu pārliecīgu mātes toksicitāti, devas izvēlei jāizmanto esošie dati. Tomēr, ja vielu saņēmušajām mātītēm ir novērojama pārliecīga toksicitāte, tādi dzīvnieki ir humāni jānogalina. Ja vairāki grūsni dzīvnieki uzrāda pārliecīgas toksicitātes pazīmes, ir jāapsver attiecīgās devas grupas likvidēšana. Ja testējamo vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jāizdara vienā devā, izmantojot kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas kanulu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml/100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumus, ko var ievadīt 2 ml/100 g uz ķermeņa svaru. Ja par nesēju izmanto kukurūzas eļļu, tilpums nedrīkst pārsniegt 0,4 ml/100 g ķermeņa svara. Testa tilpuma izmaiņas ir jāsamazina līdz minimumam, pielāgojot koncentrāciju, lai nodrošinātu nemainīgu tilpumu pie visiem devu līmeņiem.

1.6.6. **Mātīšu novērošana**

Klīniskie novērojumi jāizdara un tie jāreģistrē vismaz reizi dienā, vēlams katru dienu vienā(-os) laikā(-os) un ņemot vērā sagaidāmo iedarbību maksimuma laika posmu pēc dozēšanas. Dzīvnieku stāvoklis jāreģistrē, iekļaujot mirstību, mirstošos dzīvniekus, nepārejošas izturēšanās izmaiņas un visas atklātās toksicitātes pazīmes.

1.6.7. **Ķermeņa svars un barības patēriņš**

Dzīvnieki jānosver grūsnības 0. dienā vai vēlākais 3. grūtniecības dienā, ja sapārotos dzīvniekus ir piegādājis audzētājs no ārpuses, pirmajā dozēšanas dienā, vismaz reizi trīs dienās dozēšanas laika posmā un paredzētās nogalināšanas dienā.

▼B

Barības patēriņš ir jāreģistrē ik pēc trim dienām, un tam jāsakrīt ar ķermeņa svara noteikšanas dienām.

1.6.8. **Pēcnāves pārbaude**

Sievišķā dzimuma dzīvnieki jānogalina vienu dienu pirms sagaidāmās dzemdību dienas. Sievišķā dzimuma dzīvnieki, kuriem novēro aborta vai priekšlaicīgu dzemdību pazīmes, jānogalina un jāizdara to rūpīga makroskopiskā pārbaude.

Tūlīt pēc nogalināšanas vai nāves pētījuma laikā mātīte makroskopiski jāpārbauda attiecībā uz strukturālām anomālijām vai patoloģiskām izmaiņām. Mātīšu vērtēšana ķeizargrieziena laikā un turpmākās augļu analīzes jāveic, vēlams, bez zināšanām par vielas saņemšanas grupu, lai līdz minimumam samazinātu neobjektivitāti.

1.6.9. **Dzemdes satura apskate**

Tūlīt pēc nogalināšanas vai iespējami drīz pēc nāves dzemdes ir jāizņem un jāpārliecinās par dzīvnieku grūsnības statusu. Dzemdes, kas šķiet negravīdas, ir jāpārbauda turpmāk (piemēram, izmantojot amonija sulfīda iekrāsošanos grauzējiem un Salevska iekrāsošanos vai piemērotu alternatīvu metodi trušiem), lai apstiprinātu negrūsnības statusu (5).

Gravīdas dzemdes, iekļaujot dzemdes kaklu, ir jānosver. Gravīdas dzemdes svars nav jāiegūst no dzīvniekiem, kas pētījuma laikā atrasti nobeigušies.

Grūsniem dzīvniekiem jānosaka *corpora lutea* skaits.

Dzemdes saturs ir jāpārbauda, lai noteiktu nobeigušos embriju vai augļu skaitu un dzīvotspējīgo augļu skaitu. Lai noteiktu apaugļošanas produkta relatīvo nobeigšanās laiku, ir jāapraksta resorbcijas pakāpe (skatīt 1.2. punktu).

1.6.10. **Augļu pārbaude**

Jānosaka katra augļa dzimums un ķermeņa svars.

Katrs auglis jāpārbauda attiecībā uz ārējām izmaiņām (6).

Augļi jāapskata attiecībā uz skeleta un mīksto audu izmaiņām (piemēram, novirzēm un malformācijām jeb anomālijām) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Augļu izmaiņu iedalīšana kategorijās ir vēlama, bet nav nepieciešama. Ja iedalīšanu kategorijās veic, ir skaidri jānorāda katras kategorijas noteikšanas kritēriji. Īpaša uzmanība jāvelta reproduktīvajam traktam, kas ir jāpārbauda attiecībā uz izmainītas attīstības pazīmēm.

Attiecībā uz grauzējiem aptuveni puse no katra metiena ir jāpreparē un jāpārbauda attiecībā uz skeleta izmaiņām. Atlikusī puse jāpreparē un jāpārbauda attiecībā uz mīksto audu izmaiņām, izmantojot pieņemtas vai piemērotas sēriju sekcijas metodes vai uzmanīgu makroskopiskās secēšanas paņēmienu.

▼B

Dzīvniekiem, kas nav grauzēji, piemēram, trušiem, visi augļi ir jāpārbauda attiecībā gan uz mīksto audu, gan skeleta izmaiņām. Šo augļu ķermeņus vērtē, attiecībā uz mīksto audu izmaiņām izdarot rūpīgu sekciju, kas var iekļaut procedūras tālākai sirds iekšējās struktūras novērtēšanai (25). Pusei no tā apskatītajiem augļiem ir jānoņem galvas un jāapstrādā mīksto audu izmaiņu novērtēšanai (iekļaujot acis, smadzenes, deguna ejas un mēli), izmantojot standarta sēriju secēšanas metodes (26) vai tikpat jutīgu metodi. Minēto augļu ķermeņi un atlikušie neskartie augļi ir jāapstrādā un jāpārbauda attiecībā uz skeleta izmaiņām, izmantojot tās pašas metodes, kas aprakstītas saistībā ar grauzējiem.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Datus reģistrē atsevišķi mātītēm, kā arī to pēcnācējiem un apvieno tabulas veidā, katrai testa grupai un katrai paaudzei parādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, testa laikā atrasto nobeigušos vai humānu iemeslu dēļ nogalināto dzīvnieku skaitu, katras nobeigšanās vai humānās nogalināšanas laiku, grūsno sievišķā dzimuma dzīvnieku skaitu, toksicitātes pazīmes uzrādījušo dzīvnieku skaitu, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, iekļaujot toksisko iedarbību parādīšanās brīdi, ilgumu un smagumu, embriju/augļu novērojumu veidu un visus attiecīgos datus par metienu.

Skaitliskie rezultāti ir jānovērtē ar piemērotu statistikas metodi, izmantojot metienu kā datu analīzes vienību. Jāizmanto vispāratzīta statistikas metode; statistikas metodes ir jāizvēlas kā daļa no pētījuma projekta un jāpamato. Jāreģistrē arī dati par dzīvniekiem, kas nav izdzīvojuši līdz paredzētajai nogalināšanai. Attiecīgā gadījumā minētos datus var iekļaut grupas vidējos lielumos. No tādiem dzīvniekiem iegūto datu relevance un tātad to iekļaušana vai neiekļaušana grupas vidējā(-os) lielumā(-os) ir jāpamato un jāizspriež katrā atsevišķā gadījumā.

2.2. REZULTĀTU IZVĒRTĒŠANA

Prenatālās ontoģenēzes toksicitātes dati ir jānovērtē novērotās iedarbības izteiksmē. Vērtējumā ir šāda informācija:

— mātes un embriju/augļu testa rezultāti, iekļaujot sakarības novērtējumu vai tās trūkumu starp testējamās vielas iedarbību uz dzīvniekiem un visu konstatāciju biežumu un smagumu,

— augļu ārējo, mīksto audu un skeleta izmaiņu iedalīšanai kategorijās izmantotie kritēriji, ja iedalīšana kategorijās ir veikta,

▼B

— attiecīgā gadījumā vēsturiskie kontroles dati, lai veicinātu pētījuma rezultātu interpretāciju,

— visā procentuālā daudzuma vai koeficientu aprēķināšanā izmantotie skaitļi,

— attiecīgā gadījumā pētījuma rezultātu atbilstoša statistiskā analīze, kurā jāiekļauj pietiekama informācija par analīzes metodi, tā, lai neatkarīgs recenzents/statistiķis varētu atkārtoti novērtēt un rekonstruēt analīzi.

Katrā pētījumā, kas rāda, ka toksiskās iedarbības nav, ir jāapsver turpmākie pētījumi, lai noteiktu testējamās vielas uzsūkšanos un bioloģisko pieejamību.

2.3. REZULTĀTU INTERPRETĒŠANA

Prenatālā ontoģenēzes toksicitāte sniedz informāciju par vielas atkārtotas iedarbības ietekmi grūsnības laikā uz mātītēm un uz to pēcnācēju intrauterīno attīstību. Pētījuma rezultāti ir jāinterpretē kopā ar subhronisko, reprodukcijas, toksikokinētisko un citu pētījumu datiem. Tā kā tiek uzsvērta vispārējā toksicitāte mātes toksicitātes un ontoģenēzes toksicitātes beigu punktu izteiksmē, pētījuma rezultāti zināmā mērā ļauj atšķirt iedarbību uz attīstību, kas sastopama, nepastāvot vispārējai toksicitātei, un iedarbību uz attīstību, ko izraisa tikai līmeņi, kas ir toksiski arī mātesdzīvniekam (27).

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības,

— identifikācija, iekļaujot *CAS* numuru, ja tas ir zināms/noteikts,

— tīrība.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga un līnija,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

Testa apstākļi:

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīkas ziņas par testējamās vielas preparāta/barības sagatavošanu, iegūto koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

▼B

— sīkas ziņas par testējamās vielas ievadīšanu,

— testējamās vielas koncentrācijas (milj. daļas) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa svara dienā) attiecīgā gadījumā,

— vides apstākļi,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti

Dati par mātes toksisko atbildes reakciju uz devu iekļaujot, bet neaprobežojoties ar:

— dzīvnieku skaitu testa sākumā, izdzīvojušo dzīvnieku skaitu, grūsno dzīvnieku skaitu, abortu skaitu, priekšlaicīgu dzemdību skaitu,

— nāves iestāšanās dienu testa laikā vai norādi, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— dati par dzīvniekiem, kas nav izdzīvojuši līdz plānotajai nogalināšanai, ir jāreģistrē, bet nav jāiekļauj starpgrupu statistiskajos salīdzinājumos,

— katra anomāla klīniskā simptoma novērošanas diena un tālākā attīstība,

— ķermeņa svars, ķermeņa svara izmaiņas un gravīdās dzemdes svars, neobligāti iekļaujot ķermeņa svara izmaiņas, kas koriģētas uz gravīdās dzemdes svaru,

— barības patēriņš un ūdens patēriņš, ja tas ir mērīts,

— autopsijas konstatācijas, iekļaujot dzemdes svaru,

— ir jāreģistrē iedarbības uz māti un attīstību *NOAEL* vērtības.

Attīstības beigu punkti attiecībā uz devu, metieniem ar implantāciju, iekļaujot:

— *corpora lutea* skaitu,

— implantāciju skaitu, dzīvo un mirušo augļu un resorbciju skaitu un procentuālo daudzumu,

— pre- un postimplantācijas zudumu skaitu un procentuālo daudzumu.

Attīstības beigu punkti attiecībā uz devu metieniem ar dzīviem augļiem, iekļaujot:

— dzīvu pēcnācēju skaitu un procentuālo daudzumu,

— dzimumu attiecību,

— augļu ķermeņa svaru, vēlams pēc dzimumiem un dzimumiem kopā,

— ārējas, mīksto audu un skeleta malformācijas un citas attiecīgās izmaiņas,

— attiecīgā gadījumā kritērijus iedalīšanai kategorijās,

▼B

— augļu un metienu kopējo skaitu un procentuālo daudzumu ar ārējām, mīksto audu un skeleta izmaiņās, kā arī individuālu anomāliju un citu attiecīgu izmaiņu veidus un biežumu.

Rezultātu apspriešana.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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; p. 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; p. 386–398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialised Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; p. 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 Pathologie 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) 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; p. 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; p. 381–391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47; p. 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; p. 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. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; p. 313–320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; p. 398–408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8; p. 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; p. 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, p. 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; p. 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; p. 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; p. 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; p. 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, p. 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; p. 233–239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; p. 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, p. 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 Mammals (Version 1) Teratology 55; p. 249–292.

▼M4

B.32. KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 451 (*TG*) (2009. gads). Sākotnējos *TG 451* par kancerogenitātes pētījumiem pieņēma 1981. gadā. Šīs pārskatītās B.32. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (2) (3) (4) (5) (6). Šīs B.32. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.30. nodaļas "Hroniskās toksicitātes pētījumi" pārskatīšanai un šā pielikuma B.33. nodaļas "Apvienotie hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī B.32. testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai. Tomēr ir jāatzīmē, ka attiecībā uz farmaceitiskajiem preparātiem daži punkti un prasības var atšķirties (sk. Starptautiskās saskaņošanas konferences (*ICH*) *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).

2. Lielāko daļu kancerogenitātes pētījumu veic ar grauzēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav grauzēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šajā testēšanas metodē noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (6). Papildu norādījumi ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).

3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto kancerogenitātes pētījumos, ir orālais ceļš, ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība tiek pievērsta orālajam ievadīšanas ceļam, kas ir kancerogenitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēku veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī kancerogenitātes pētījumi ar ārīgas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādus pētījumus plāno individuāli, lai gan šeit izklāstītā testēšanas metode testējamo ķīmisko vielu kancerogenitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai ārīgas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu ar ārīgu aplikāciju (7) un ar inhalāciju (7) (8). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (9) un B.29. nodaļa (10), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (8). Ja veic testēšanu ar ārīgu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (11).

▼**M4**

5. Kancerogenitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai periodā, kurš var ilgt pat visu izmantoto sugu mūžu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, arī par iespējamu kancerogenitāti, kā arī var norādīt mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme attiecībā uz toksisku ietekmi un – negenotoksisku kancerogēnu gadījumā – attiecībā uz audzēju atbildes reakcijām un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērta arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.

6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo pētījumu mērķi citu starpā ir šādi:

— noteikt testējamās ķīmiskās vielas kancerogēnās īpašības, kas salīdzinājumā ar līdztekus uzturētām kontrolgrupām palielina neoplazmu biežumu un ļaundabīgu neoplazmu īpatsvaru vai saīsina laiku, kurā parādās neoplazmas,

— noteikt kancerogenitātes mērķorgānu vai mērķorgānus,

— noteikt neoplazmu parādīšanās laiku,

— audzējiem noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību,

— noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (*NOAEL*), vai etalondevas (*BMD*) noteikšanas sākumpunktu,

— kancerogēno ietekmi ekstrapolēt uz cilvēka ekspozīciju zemos devu līmeņos,

— sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (2) (7) (12) (13) (14) (15).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz iespējami efektīvāku kancerogenitātes potenciāla testēšanu un lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas iespējamo kancerogenitāti, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Īpaši svarīga ir informācija par prognozētā kancerogēna (2) (7) (12) (13) (14) (15) iedarbības veidu un šīs informācijas apsvēršana, jo optimālais plāns var atšķirties atkarībā no tā, vai testējamā ķīmiskā viela ir zināms vai prognozēts genotoksisks kancerogēns. Papildu norādījumi par iedarbības veida apsvērumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

8. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes, tostarp genotoksicitātes, testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus, mutagenitāti/genotoksicitāti, kancerogenitāti un citus toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas, kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami)

▼M4

un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Kancerogenitātes novērtēšana ir jāveic pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Arī īsi vēža izraisīšanas/veicināšanas testi varētu sniegt lietderīgu informāciju. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa daļu jāuzskata arī kancerogenitātes testēšana ar vairākposmu pieeju (16) (17) (18) (19).

9. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākoriģē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze par kumulatīvajiem audzēju riskiem attiecībā pret izdzīvošanas ilgumu, analīze par to, cik ilgā laikā parādās audzējs, un analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analīzēm un galvenās atsauces uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (20).

10. Veicot kancerogenitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (21), it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: *"Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvniekam izpaužas klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem informēts lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."*

11. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (22) (23). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski situācijā, kad ir jāveic apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums (šā pielikuma B.33. nodaļa) (12. punkts).

12. Jāapsver arī iespēja veikt apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šā pielikuma B.30. nodaļa) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (šī B.32. testēšanas metode). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazemināta datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (11. un 22.–25. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi.

▼M4

13. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

TESTA PRINCIPS

14. Testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām lielāko daļu šo dzīvnieku mūža, parasti to dara orāli. Var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai ārīgu aplikāciju. Dzīvniekus rūpīgi novēro, vai tiem neparādās toksicitātes pazīmes un neattīstās neoplastiski bojājumi. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko nonāvē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

15. Šī testēšanas metode galvenokārt aptver kancerogenitātes novērtēšanu un izvērtēšanu attiecībā uz grauzējiem (sk. 2. punktu). Var apsvērt tādu sugu izmantošanu, kas nav grauzēji, ja pieejami dati norāda, ka šādas sugas ir piemērotākas, lai prognozētu ietekmi uz cilvēka veselību. Sugu izvēle ir jāpamato. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Lai gan peļu izmantošanai kancerogenitātes testos var būt ierobežota lietderība (24) (25) (26), saskaņā ar dažām spēkā esošām regulatīvajām programmām joprojām ir jāizdara kancerogenitātes testi ar pelēm, ja vien netiek konstatēts, ka šāds pētījums nav zinātniski vajadzīgs. Žurkas un peles ir bijušas ieteicamie eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm iezīmēm, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

16. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Kancerogenitātes pētījumu ieteicams veikt ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os), lai gan, ja ir zināms, ka ar šīs līnijas un izcelsmes dzīvniekiem ir problemātiski sasniegt vispārpieņemtos kritērijus attiecībā uz izdzīvošanu ilgtermiņa pētījumos (sk. Norādījumu dokumentu Nr. 116 (7)), ir jāapsver, vai neizmantot tādu dzīvnieku līniju, kam ir pieņemams izdzīvošanas rādītājs ilgtermiņa pētījumā. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Turēšana un barošana

17. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (27) (28) (29). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un tādu uztura piesārņotāju, arī pesticīdu

▼M4

atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsagatavo un galaziņojumā jāietver analītiska informācija par uzturvielu un uztura piesārņojuma līmeņiem. Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība gan nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukumu, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

18. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc zīdīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katra dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

19. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai būtu iespējams veikt rūpīgu bioloģisku un statistisku izvērtēšanu. Tādēļ katras devas grupā un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz 50 dzīvniekiem no katra dzimuma. Atkarībā no pētījuma mērķa var būt iespējams palielināt galveno aplēšu statistisko nozīmību, nevienmērīgi sadalot dzīvniekus dažādu devu grupās, mazāku devu grupās ietverot vairāk nekā 50 dzīvniekus, piemēram, lai aplēstu kancerogenitātes potenciālu mazu devu gadījumā. Tomēr ir jāapzinās, ka grupas lieluma neliels palielinājums tikai nedaudz palielinās pētījuma statistisko nozīmību. Papildu informācija par tādu pētījuma statistikas plānu un devu līmeņu izvēli, lai iespējami palielinātu statistisko nozīmību, ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītgrupas (indikatorgrupas)

20. Lai iegūtu informāciju par neoplastisko pārmaiņu norisi un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, piemēram, 12. mēnesī. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. Ja pētījuma plāns paredz dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, to dzīvnieku skaits katras devas grupā, ko paredzēts nonāvēt testa laikā, parasti būs 10 dzīvnieki no katra dzimuma, un pētījuma plānā paredzētais dzīvnieku kopskaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus līdz pētījuma beigām plānots nonāvēt. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikatordzīvnieku grupu (parasti pieci dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārraudzītu slimības stāvokli (30). Papildu norādījumi ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

▼M4

Devu grupas un dozējums

21. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi un jānodrošina paralēla kontrole. Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotas devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgajām ķīmiskajām vielām.

22. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis jāizvēlas ar nolūku noteikt galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagu toksicitāti, saslimstību un mirstību. Vienlaikus ņemot vērā turpmāk 23. punktā izklāstītos faktorus, augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %). Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru.

23. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tādus, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un – atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida – *NOAEL* vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, *BMD* (sk. 25. punktu) zemākajā devas līmenī. No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds slieksnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai.

24. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.

25. Kā plašāk aplūkots Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:

— devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,

— toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtām devām,

— jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,

— iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,

▼M4

— devas un atbildes reakcijas sakarības līknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās *BMD* vai prognozētā sliekšņa diapazonā,

— apsvērumi par paredzamiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem.

26. Kontrolgrupa ir vielu nesaņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās tā patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

27. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tādus preparātus, attiecībā uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmiens pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceitiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, arī pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažiem scenārijiem, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.

28. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.

29. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgtermiņa toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar barību, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.

▼M4

30. Orālas ievadīšanas gadījumā grauzējiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā), parasti 24 mēnešus (sk. arī 32. punktu). Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (11), un tas ilgst 24 mēnešus. Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecu dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 24 mēneši. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (9).

31. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā dalītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un grauzējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (31). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatšķaida, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

32. Pētījums ar grauzējiem parasti ilgst 24 mēnešus – lielāko daļu no izmantojamo dzīvnieku mūža. Atkarībā no pētījumā izmantoto dzīvnieku sugu līnijas mūža ilguma pētījuma ilgums var būt lielāks vai mazāks, bet tas ir jāpamato. Konkrētām peļu līnijām, piemēram, līnijām AKR/J, C3H/J vai C57BL/6J, piemērotāki varētu būt 18 mēneši. Turpmāk ir doti daži norādījumi par ilgumu, pētījuma izbeigšanu un izdzīvošanu; papildu norādījumi, tostarp apsvērums par to, kad attiecībā uz izdzīvošanu pētījumā pieņemt, ka kancerogenitātes pētījums ir negatīvs, ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).

— Pētījuma izbeigšana ir jāapsver gadījumā, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits zemāko devu grupās vai kontrolgrupā ir zem 25 %.

— Tādā gadījumā, ja toksicitātes dēļ priekšlaicīgi nobeidzas tikai augstākās devas grupa, pētījumu nevajadzētu izbeigt.

— Katra dzimuma izdzīvošana ir jāaplūko atsevišķi.

— Ja no pētījuma pieejamie dati vairs nav pietiekami statistiski derīgai izvērtēšanai, pētījumu nevajadzētu turpināt.

▼**M4**

NOVĒROJUMI

33. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Reizi dienā turklāt jāpārbauda, vai dzīvniekiem nav parādījušās konkrētas toksikoloģiski būtiskas pazīmes, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota mākslīgā barošana. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un turpmāko attīstību.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

34. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija, klīniskā bioķīmija un citi mērījumi

35. Lai no pētījuma iegūtu iespējami vairāk informācijas, it sevišķi attiecībā uz iedarbības veida apsvērumiem, var ņemt asins paraugus hematoloģiskajiem un klīniski bioķīmiskajiem izmeklējumiem. Lēmumu par to pieņem pētījuma vadītājs. Piemērotas var būt arī urīnanalīzes. Papildu norādījumi par šādu paraugu ņemšanas vērtību kancerogenitātes pētījuma ietvaros ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ja uzskata, ka tas piemēroti, asins paraugus hematoloģiskiem un klīniskās ķīmijas izmeklējumiem var ņemt, veicot nonāvēšanu testa laikā (20. punkts) un pētījuma beigās tās ņemot vismaz 10 dzīvniekiem no katra dzimuma katrā grupā. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītas vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot, un vajadzības gadījumā jāglabā piemērotos apstākļos. Izmeklēšanai var sagatavot arī asins uztriepes, it sevišķi, ja ir konstatējams, ka kaula smadzenes ir mērķorgāns, lai gan šāda izmeklējuma vērtība kancerogēnā/onkogēnā potenciāla novērtēšanā ir tikusi apšaubīta (32).

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

36. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem, izņemot indikatordzīvniekus (sk. 20. punktu) un citus satelītgrupas dzīvniekus, jāveic pilna, detalizēta autopsija, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Indikatordzīvniekiem un citiem satelītgrupas dzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs). Orgānu svara noteikšana parasti neietilpst kancerogenitātes pētījumā, jo geriatriskas pārmaiņas un – vēlākā posmā – audzēju attīstība mazina orgānu svara datu lietderību. Tomēr orgānu svaru noteikt var būt ļoti svarīgi apliecinājuma nozīmes izvērtēšanā un pēc tā it sevišķi var spriest par iedarbības veidu. Ja orgānu svara noteikšana ietilpst satelītpētījumā, dati jāievāc ne vēlāk kā vienu gadu pēc pētījuma sākšanas.

▼M4

37. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (33), ir jākonservē turpmāk sarakstā norādītie audi (kvadrātiekavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemdes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemdes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranazālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augštilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezums un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārīgu aplikāciju ir jāsaglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. un B.29. nodaļas noteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas ietverti orālās ievadīšanas orgānu sarakstā.

▼M4

Histopatoloģija

38. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (33). Ir jāizmeklē vismaz šādi audi:

— visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,

— visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,

— visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas, tostarp audzēji,

— ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas histopatoloģiskās pārmaiņas, tie paši audi ir jāizmeklē visu pārējo devu grupu dzīvniekiem,

— pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

39. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus, un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam izpaužas toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.

40. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralēlajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.

41. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (9. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.

Testēšanas pārskats

42. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati,

▼**M4**

— ķīmiskās vielas izcelsme,

— sērijas numurs,

— ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

— ievadīšanas ceļa un devu izvēles pamatojums,

— attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma / uztura preparātu,

— analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas ceļš un sīka informācija par ievadīšanu,

— inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajā devā,

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati)

Vispārīgi:

— izdzīvošanas dati,

— ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,

— barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,

— toksikokinētiskie dati, ja pieejami,

— oftalmoskopija (ja pieejama),

— hematoloģija (ja pieejama),

— klīniskā ķīmija (ja pieejama).

▼**M4**

Klīniskie konstatējumi:

— toksicitātes pazīmes,

— visu anomāliju biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums),

— klīniski novērotas ietekmes veids, smagums un ilgums (pārejoša vai pastāvīga).

Autopsijas dati:

— ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,

— orgānu svars un to attiecības, ja vajadzīgs,

— autopsijas atrade; anomāliju biežums un smagums.

Histopatoloģija:

— histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, kas nav saistīti ar neoplastiku,

— neoplastikas histopatoloģiskā atrade,

— korelācijas starp makroskopisku un mikroskopisku atradi,

— visu ar ievadīšanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts, kurā ietverta arī smaguma klasifikācija,

— ziņojums par priekšmetstikliņu salīdzinošo izvērtēšanu.

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Komentāri par rezultātiem, arī:

— modelēšanas pieeju iztirzājums,

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— vēsturiskie kontroldati,

— apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,

— *BMD*, *NOAEL* vai *LOAEL* noteikšana,

— būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".

(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) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".

(10) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".

(11) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".

(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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).

(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. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

B.33. **APVIENOTIE HRONISKĀS TOKSICITĀTES UN KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 453 (*TG*) (2009. gads). Sākotnējos *TG 453* pieņēma 1981. gadā. Šīs atjauninātās B.33. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (1) (2) (3) (4) (5). Šīs B.33. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.32. nodaļas "Kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai un šā pielikuma B.30. nodaļas "Hroniskās toksicitātes pētījumi" pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai. Tomēr ir jāatzīmē, ka attiecībā uz farmaceitiskajiem preparātiem daži punkti un prasības var atšķirties (sk. Starptautiskās saskaņošanas konferences (*ICH*) *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).

2. Lielāko daļu hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu veic ar grauzēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav grauzēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šeit noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (6), kā noteikts ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).

3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumos, ir orālais ceļš, ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība tiek pievērsta orālajam ievadīšanas ceļam, kas ir hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēka veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī ilgtermiņa pētījumi ar ārīgas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādi pētījumi būs jāplāno katrā gadījumā atsevišķi, lai gan šeit izklāstītā testēšanas metode ķīmisko vielu hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai ārīgas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu ar inhalāciju (7) (8) un ar ārīgu aplikāciju (7). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (9) un B.29. nodaļa (10), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (8). Ja veic testēšanu ar ārīgu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (11).

▼M4

5. Apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko var radīt atkārtota ekspozīcija periodā, kurš var ilgt pat visu izmantoto sugu mūžu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, arī par iespējamu kancerogenitāti, kā arī norādīs mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme attiecībā uz toksisku iedarbību un – negenotoksisku kancerogēnu gadījumā – attiecībā uz audzēju atbildes reakcijām un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērta arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.

6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu mērķi citu starpā ir šādi:

— Noteikt testējamās ķīmiskās vielas kancerogēnās īpašības, kas salīdzinājumā ar līdztekus uzturētām kontrolgrupām palielina neoplazmu biežumu un ļaundabīgu neoplazmu īpatsvaru vai samazina laiku, kurā parādās neoplazmas,

— noteikt neoplazmu parādīšanās laiku,

— noteikt testējamās ķīmiskās vielas hronisko toksicitāti,

— noteikt hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes mērķorgānus,

— noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību,

— noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (*NOAEL*), vai etalondevas (*BMD*) noteikšanas sākumpunktu,

— kancerogēno ietekmi ekstrapolēt uz cilvēka ekspozīciju zemos devu līmeņos,

— prognozēt hroniskās toksicitātes ietekmi līmeņos, kādos paredzama cilvēka ekspozīcija,

— sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (2) (7) (12) (13) (14) (15).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz toksikoloģisko īpašību iespējami efektīvāku testēšanu un lai tajā līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas iespējamo kancerogenitāti un hronisko toksicitāti, testēšanas laboratorijai, pirms tā veic pētījumu, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Īpaši svarīga ir informācija par prognozētā kancerogēna (2) (7) (12) (13) (14) (15) iedarbības veidu un šīs informācijas apsvēršana, jo optimālais plāns var atšķirties atkarībā no tā, vai testējamā ķīmiskā viela ir zināms vai prognozēts genotoksisks kancerogēns. Papildu norādījumi par iedarbības veida apsvērumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

8. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu informāciju par iedarbības veidu; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes, tostarp genotoksicitātes, testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus, mutagenitāti/genotoksicitāti, kancerogenitāti un citus toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas,

▼**M4**

kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami) un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes noteikšana ir jāveic tikai pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Arī īsi vēža izraisīšanas/veicināšanas testi varētu sniegt lietderīgu informāciju. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa daļu jāuzskata arī kancerogenitātes testēšana ar vairākposmu pieeju (16) (17) (18) (19).

9. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākoriģē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze par kumulatīvajiem audzēju riskiem attiecībā pret izdzīvošanas ilgumu, analīze par to, cik ilgā laikā parādās audzējs, un analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analīzēm un galvenās atsauces uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegtas *Guidance Document No. 116* (7), kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (20).

10. Veicot kancerogenitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (21), it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: *"Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvniekam izpaužas klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem informēts lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."*

11. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (22) (23). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski attiecībā uz šo apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu.

12. Jāapsver arī iespēja veikt šo apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu, nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šā pielikuma B.30. nodaļa) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.32. nodaļa). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, tajā izmanto mazāk dzīvnieku un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazemināta datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu, ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (11. un 22.–26. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi. Papildu norādījumi par apvienotā hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījuma plānu, kas nodrošinātu iespējami lielāku pētījuma efektivitāti tādā aspektā kā iespēja samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu, kā arī racionalizējot dažādās eksperimentu procedūras, ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

▼M4

13. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

TESTA PRINCIPS

14. Pētījuma plānam ir divi paralēli posmi – hroniskais posms un kancerogenitātes posms (ilgums norādīts attiecīgi 34. un 35. punktā). Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli, lai gan var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai ārīgu aplikāciju. Hroniskajā posmā testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai, parasti 12 mēnešus, lai gan var izraudzīties arī garākus vai īsākus periodus atkarībā no regulatīvajām prasībām (sk. 34. punktu). Izvēlas periodu, kas ir pietiekami ilgs, lai jebkāda kumulatīvas toksicitātes ietekme kļūtu pamanāma bez geriatrisku pārmaiņu maldinošajām sekām. Pētījuma plāns var ietvert arī vienu vai vairākas dzīvnieku nonāvēšanas testa laikā, piemēram, trešajā un sestajā mēnesī, un var tikt ietvertas papildu dzīvnieku grupas, lai šim apstāklim pielāgotos (sk. 20. punktu). Kancerogenitātes posmā testējamo ķīmisko vielu ievada katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām, un ekspozīcijas laiks aptver ievērojamu to mūža daļu. Abos posmos dzīvniekus rūpīgi novēro, vai tiem neparādās toksicitātes pazīmes un neattīstās neoplastiski bojājumi. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko nonāvē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

15. Šī testēšanas metode galvenokārt attiecas uz hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes novērtēšanu un izvērtēšanu attiecībā uz grauzējiem (sk. 2. punktu). Var apsvērt tādu sugu izmantošanu, kas nav grauzēji, ja pieejami dati norāda, ka šādas sugas ir piemērotākas, lai prognozētu ietekmi uz cilvēka veselību. Sugu izvēle ir jāpamato. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Lai gan peļu izmantošanai kancerogenitātes testos var būt ierobežota lietderība (24) (25) (26), saskaņā ar dažām spēkā esošām regulatīvajām programmām joprojām ir jāizdara kancerogenitātes testi ar pelēm, ja vien netiek konstatēts, ka šāds pētījums nav zinātniski vajadzīgs. Žurkas un peles ir bijušas ieteicamie eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm iezīmēm, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Ja jāveic hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi ar sugām, kas nav grauzēji, šie pētījumi jāplāno un jāīsteno, balstoties uz principiem, kuri izklāstīti šajā testēšanas metodē, kā arī šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (6). Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

16. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums ir jāveic ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os), lai gan, ja ir zināms, ka ar šīs līnijas un izcelsmes dzīvniekiem ir problemātiski sasniegt vispārpieņemtos kritērijus attiecībā uz izdzīvošanu ilgtermiņa pētījumos (sk. Norādījumu dokumentu Nr. 116 (7)), ir jāapsver, vai neizmantot tādu dzīvnieku līniju, kam ir pieņemams izdzīvošanas rādītājs ilgtermiņa pētījumā. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

▼M4

Turēšanas un barošanas apstākļi

17. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (27) (28) (29). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un uztura piesārņotāju, arī pesticīdu atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsagatavo un galaziņojumā jāietver analītiska informācija par uzturvielu un uztura piesārņojuma līmeņiem. Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība gan nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukumu, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

18. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc zīdīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katra dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

19. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai būtu iespējams veikt rūpīgu bioloģisku un statistisku izvērtēšanu. Grauzējiem katrā devas grupā, kas paredzēta pētījuma kancerogenitātes posmam (kā izklāstīts 22. punktā), un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz 50 dzīvniekiem no katra dzimuma. Atkarībā no pētījuma mērķa galveno aplēšu statistisko nozīmību var palielināt, dzīvniekus dažādu devu grupās sadalot nevienmērīgi un mazāku devu grupās ietverot vairāk nekā 50 dzīvniekus, piemēram, lai aplēstu kancerogenitātes potenciālu mazu devu gadījumā. Tomēr ir jāapzinās, ka grupas lieluma neliels palielinājums tikai nedaudz paaugstinās pētījuma statistisko nozīmību. Grauzējiem katrā devas grupā, kas paredzēta pētījuma hroniskas toksicitātes posmam (kā izklāstīts 22. punktā), un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz

▼M4

10 dzīvniekiem no katra dzimuma. Jānorāda, ka šis skaits ir mazāks nekā hroniskās toksicitātes pētījumā (šā pielikuma B.30. nodaļa). Šā apvienotā pētījuma hroniskās toksicitātes posma datus, kas iegūti no grupām ar mazāku dzīvnieku skaitu, tomēr interpretēs ar tādu datu atbalstu, kas iegūti no lielāka dzīvnieku skaita pētījuma kancerogenitātes posmā. Pētījumos ar pelēm hroniskās toksicitātes posmā katras devas grupā var būt nepieciešami papildu dzīvnieki, lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus. Papildu informācija par tādu pētījuma statistikas plānu un devu līmeņu izvēli, lai iespējami palielinātu statistisko nozīmību, ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītgrupa un indikatordzīvnieki

20. Lai iegūtu informāciju par tādu pārmaiņu norisi, kas nav neoplastiskas pārmaiņas, un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, piemēram, sestajā mēnesī hroniskās toksicitātes posmā. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. No dzīvniekiem, ko izmanto pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, kurš parasti ilgst 12 mēnešus (34. punkts), iegūst arī testa laikā izdarīto nonāvēšanu datus pētījuma kancerogenitātes posmam, tādējādi samazinot kopējo izmantoto dzīvnieku skaitu. Lai uzraudzītu jebkādu testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, pētījuma hroniskās toksicitātes posmā var paredzēt arī satelītgrupas. Šādas grupas var nodrošināt tikai pētījuma augstākā devas līmeņa grupai un kontrolgrupai. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikatordzīvnieku grupu (parasti pieci dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārraudzītu slimības stāvokli (30). Papildu norādījumi par to, kā plānot pētījumu, lai ietvertu nonāvēšanu testa laikā, satelītgrupas un indikatordzīvniekus, vienlaikus līdz minimumam samazinot kopējo izmantoto dzīvnieku skaitu, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

21. Ja pētījuma plāns ietver satelītgrupas un/vai dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, to dzīvnieku skaits katras devas grupā, kas paredzēti šādiem nolūkiem, parasti būs 10 dzīvnieki no katra dzimuma, un pētījuma plānā ietvertais dzīvnieku kopskaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus paredzēts nonāvēt pirms pētījuma beigām. Dzīvniekiem, ko paredzēts nonāvēt testa laikā, un satelītgrupām parasti ir jāveic tādi paši novērojumi, tostarp jānovēro ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš, jāveic hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mērījumi, kā arī patoloģiskie izmeklējumi, kā dzīvniekiem galvenā pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, lai gan var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte.

Devu grupas un dozējums

22. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Gan hroniskās toksicitātes posmā, gan kancerogenitātes posmā ir jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi un jānodrošina paralēla kontrole. Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotas devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgām ķīmiskajām vielām.

▼**M4**

23. Pētījuma hroniskās toksicitātes posmā pilnu pētījumu ar trīs devu līmeņiem var uzskatīt par nevajadzīgu, ja var prognozēt, ka testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, netiks novērota nelabvēlīga ietekme. Tas jāpamato ar provizoriskos pētījumos iegūtu informāciju un apsvērumu, ka, balstoties uz datiem par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām, var prognozēt, ka viela nebūs toksiska. Var piemērot ierobežojumu 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izņemot gadījumu, ja cilvēka ekspozīcija liecina, ka jāizmanto augstāks devas līmenis.

24. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis jāizvēlas ar nolūku noteikt galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagu toksicitāti, saslimstību un mirstību. Augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %). Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru.

25. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tādus, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un – atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida – *NOAEL* vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, *BMD* (sk. 27. punktu). No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds slieksnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai. Veicot apvienoto kancerogenitātes un hroniskās toksicitātes pētījumu, galvenais mērķis būs iegūt informāciju kancerogenitātes riska novērtēšanas vajadzībām, savukārt informācija par hronisko toksicitāti parasti būs papildu mērķis. Tas ir jāpatur prātā, izvēloties pētījuma devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem.

26. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no pētījuma mērķiem un testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar detalizēti norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli, un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.

27. Kā plašāk izklāstīts Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:

— devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,

— toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtām devām,

— jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,

▼M4

— iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,

— devas un atbildes reakcijas sakarības līknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās *BMD* vai prognozētā sliekšņa diapazonā,

— apsvērumi par paredzamiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem, it sevišķi vidējo un zemāko devu izvēlē.

28. Kontrolgrupa ir vielu nesaņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās barības patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

29. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tādus preparātus, attiecībā uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmiens pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceitiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, tostarp pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažiem scenārijiem, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.

30. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.

31. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgtermiņa toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar uzturu, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.

▼M4

32. Orālas ievadīšanas gadījumā dzīvniekiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā) 12 mēnešus (hroniskais posms) vai 24 mēnešus (kancerogenitātes posms), sk. arī 33. un 34. punktu. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (11), un tas ilgst 12 mēnešus (hroniskais posms) vai 24 mēnešus (kancerogenitātes posms). Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecas dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 12 mēneši (hroniskais posms) vai 24 mēneši (kancerogenitātes posms). Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgām sugām raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (9).

33. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā dalītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un grauzējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (31). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatšķaida, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

34. Šā pētījuma hroniskā posma devu došanas periods un ilgums parasti būs 12 mēneši, lai gan pētījuma plāns pieļauj arī (un to var izmantot, lai veiktu) īsākus (piemēram, sešu vai deviņu mēnešu) vai garākus (piemēram, 18 vai 24 mēnešu) pētījumus atkarībā no konkrētu tiesisko regulējumu prasībām vai konkrētiem mehānistiskiem mērķiem. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Visu devu grupas, kas ietvertas šajā posmā, paredzētajā termiņā tiks nonāvētas, lai izvērtētu hronisko toksicitāti un ar neoplastiku nesaistītas patoloģijas. Satelītgrupas, kas ir ietvertas, lai uzraudzītu jebkādu testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, vismaz četras nedēļas un ne ilgāk kā vienu trešdaļu kopējā pētījuma laika pēc ekspozīcijas pārtraukšanas ir jātur bez devu ievadīšanas.

35. Šā pētījuma kancerogenitātes posma ilgums grauzējiem parasti būs 24 mēneši, kas ir lielākā daļa izmantojamo dzīvnieku parastā mūža ilguma. Var izmantot īsākus vai garākus pētījuma ilgumus atkarībā no pētījumā izmantoto dzīvnieku sugu līnijas mūža ilguma, bet tas ir jāpamato. Konkrētām peļu līnijām, piemēram, AKR/J, C3H/J vai C57BL/6J līnijām, piemērotāki varētu būt 18 mēneši. Turpmāk doti daži norādījumi par ilgumu, pētījuma izbeigšanu un izdzīvošanu; papildu norādījumi, tostarp apsvērums par to, kad attiecībā uz izdzīvošanu pētījumā pieņemt, ka kancerogenitātes pētījums ir negatīvs, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

▼M4

— Pētījuma izbeigšana ir jāapsver gadījumā, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits zemāko devu grupās vai kontrolgrupā ir zem 25 %.

— Tādā gadījumā, ja toksicitātes dēļ priekšlaicīgi nobeidzas tikai augstākās devas grupa, pētījumu nevajadzētu izbeigt.

— Katra dzimuma izdzīvošana ir jāaplūko atsevišķi.

— Ja no pētījuma pieejamie dati vairs nav pietiekami statistiski derīgai izvērtēšanai, pētījumu nevajadzētu turpināt.

NOVĒROJUMI (HRONISKĀS TOKSICITĀTES POSMS)

36. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma laiku pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota mākslīgā barošana.

37. Visiem dzīvniekiem vismaz vienreiz pirms pirmās ekspozīcijas (lai vienam un tam pašam dzīvniekam varētu izdarīt salīdzināšanu), pētījuma pirmās nedēļas beigās un reizi mēnesī pēc tam ir jāveic detalizēti klīniskie novērojumi. Novērojumu protokols jāparedz tāds, lai iespējami samazinātos variācijas starp atsevišķiem novērotājiem un lai tās nebūtu atkarīgas no testa grupas. Šie novērojumi ir jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, standartnožogojumā un visos gadījumos vienos un tajos pašos laikos. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai novērošanas apstākļu variācijas būtu minimālas. Protokolējamās pazīmēs cita starpā jāiekļauj ādas, apmatojuma, acu, gļotādas, sekrēcijas un izdalījumu, kā arī veģetatīvās aktivitātes pārmaiņas (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas un neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (32).

38. Ar oftalmoskopu vai ar citu piemērotu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas pirmās ievadīšanas ir jāveic oftalmoloģiska izmeklēšana. Pētījuma beigās šo izmeklēšanu ieteicams veikt visiem dzīvniekiem vai vismaz dzīvniekiem lielāko devu un kontroles grupās. Ja atklāj ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki. Ja strukturāla analīze vai cita informācija liecina par toksicitāti acīs, jāpalielina acu izmeklēšanas biežums.

39. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt neirotoksisku ietekmi, var pēc izvēles novērtēt to izraisītās sensoriskās reakcijas uz dažāda veida kairinājumiem (32) (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinājumiem) (33) (34) (35), satveršanas stiprumu (36) un motorisko aktivitāti (37), pirms sāk pētījumu, kā arī ik pa trijiem mēnešiem pēc pētījuma sākšanas līdz 12 mēnešiem (ieskaitot) un arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot arī alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.

▼M4

40. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt imūntoksisku ietekmi, pētījuma beigās šo beigupunktu var pēc izvēles izmeklēt vēl papildus.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

41. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija un klīniskā bioķīmija

42. Pētījumos ar grauzējiem hematoloģiskie izmeklējumi ir jāveic visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā) trešajā, sestajā un divpadsmitajā mēnesī, kā arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus pelēm (sk. 19. punktu), var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja hematoloģiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītas vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot.

43. Jāizmeklē šādi parametri (38): leikocītu kopējais un diferenciālais skaits, eritrocītu skaits, trombocītu skaits, hemoglobīna koncentrācija, hematokrīts (hematokrīta skaitlis), vidējais korpuskulārais tilpums (*MCV*), vidējais korpuskulārais hemoglobīns (*MCH*), vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija (*MCHC*), protrombīna laiks un aktivizētais daļējais tromboplastīna laiks. Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus hematoloģijas parametrus, piemēram, Heinca ķermenīšus vai citus netipiskas morfoloģijas eritrocītus, vai methemoglobīnu. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes. Ja testējamā ķīmiskā viela ietekmē hematopoētisko sistēmu, var norādīt arī retikulocītu skaitu un kaulu smadzeņu citoloģiju, lai gan šie mērījumi parasti nav jāveic.

44. Asins paraugiem, kas iegūti no visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā) ar tādiem pašiem laika intervāliem, kā norādīts hematoloģiskajiem izmeklējumiem, ir jāveic klīniski bioķīmiskie izmeklējumi, lai noteiktu būtisku toksisku ietekmi audos un tieši ietekmi uz nierēm un aknām. Lai varētu veikt visus vajadzīgos klīniski bioķīmiskos izmeklējumus pelēm, var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja klīniski bioķīmiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš

▼M4

veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ir ieteicams dzīvniekiem pirms asins paraugu ņemšanas uz nakti nedot barību (izņemot peles) ([1]). Jāizmeklē šādi parametri (38): glikoze, urīnviela (urīnvielas slāpeklis), kreatinīns, kopējais olbaltums, albumīns, kalcijs, nātrijs, kālijs, kopējais holesterīns, vismaz divi attiecīgi hepatocelulārās izvērtēšanas testi (alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, glutamātdehidrogenāze, kopējās žultskābes) (39), kā arī vismaz divi attiecīgi hepatobiliāro novērtējumu testi (alkalīnfosfatāze, gamma glutamiltransferāze, 5'-nukleotidāze, kopējais bilirubīns, kopējās žultskābes) (39). Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus klīniski bioķīmiskos parametrus, tādus kā tukšas dūšas triglicerīdi, konkrēti hormoni un holīnesterāze. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes.

45. Urīnanalīzes ir jāveic visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā), izmantojot paraugus, kas ievākti ar tādiem pašiem intervāliem kā hematoloģiskās un klīniski bioķīmiskās analīzes. Mērījumi trešajā mēnesī nav jāveic, ja urīnanalīze nav uzrādījusi nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ekspertu ieteikumā par klīniskās patoloģijas pētījumiem norādīti šādi parametri (38): izskats, tilpums, osmolaritāte vai īpatnējais svars, pH, kopējais olbaltums un glikoze. No citiem mērījumiem jāmin ketons, urobilinogēns, bilirubīns un slēptās asinis. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novērotās ietekmes izpēti, var izmantot papildu parametrus.

46. Parasti tiek uzskatīts, ka pētījumos ar suņiem pirms vielas ievadīšanas ir vajadzīgi hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mainīgie izejlielumi, bet pētījumos ar grauzējiem tie nav jānosaka (38). Tomēr, ja vēsturiskie izejdati (sk. 58. punktu) ir nepietiekami, jāapsver iespēja šādus datus iegūt.

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

47. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem parasti veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Tomēr var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā, vai satelītgrupām), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte (sk. 21. punktu). Šiem dzīvniekiem nav jāveic autopsija un sekojošajos punktos aprakstītās turpmākās procedūras. Indikatordzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs).

([1]) Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekiem pirms asins ņemšanas uz nakti nedot barību. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami izraisītu palielinātu mainību, kam būtu tendence maskēt neizteiktu iedarbību un kas apgrūtinātu interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var traucēt dzīvnieku vispārīgo vielmaiņu un – jo īpaši barošanas pētījumos – var izjaukt testējamās ķīmiskās vielas ikdienas iedarbību. Visi dzīvnieki ir jānovērtē vienādā fizioloģiskā stāvoklī, tādēļ detalizētus novērtējumus vai neiroloģiskos novērtējumus ir jāplāno veikt citā dienā, nevis dienā, kad ņem klīniski bioķīmiskos paraugus.

▼**M4**

48. Orgānu svars ir jānosaka visiem dzīvniekiem, izņemot tos, kas ir izslēgti saskaņā ar 47. punkta pēdējo daļu. Visu dzīvnieku (izņemot dzīvniekus, kas atrasti mirstoši un/vai ir nonāvēti pētījuma laikā) virsnieru dziedzeri, smadzenes, sēklinieku piedēkļi, sirds, nieres, aknas, olnīcas, liesa, sēklinieki, vairogdziedzeris (nosvērts pēc fiksācijas kopā ar epitēlijķermenīšiem) un dzemde ir pēc vajadzības jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem, un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic natīvais svars.

49. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (40), ir jāsaglabā turpmāk norādītie audi (kvadrātiekavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemdes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemdes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranazālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezums un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

▼M4

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārīgu aplikāciju ir jāsaglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (9) un šā pielikuma B.29. nodaļas (10) noteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu.

Histopatoloģija

50. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (40). Ir jāveic vismaz šādi histopatoloģiskie izmeklējumi:

— visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,

— visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,

— visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas,

— mērķaudi vai audi, kas uzrāda ar ievadīšanu saistītas pārmaiņas lielākās devas grupā, no visiem dzīvniekiem visu pārējo devu grupās,

— pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

NOVĒROJUMI (KANCEROGENITĀTES POSMS)

51. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Reizi dienā turklāt jāpārbauda, vai dzīvniekiem nav parādījušās konkrētas toksikoloģiski būtiskas pazīmes. Ja pētījumos izmanto mākslīgo barošanu, dzīvnieki ir jāpārbauda periodā tūlīt pēc devas ievadīšanas. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un turpmāko attīstību.

52. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

▼**M4**

Hematoloģija, klīniskā bioķīmija un citi mērījumi

53. Lai no pētījuma iegūtu iespējami vairāk informācijas, it sevišķi attiecībā uz iedarbības veida apsvērumiem, var ņemt asins paraugus hematoloģiskajiem un klīniski bioķīmiskajiem izmeklējumiem, lai gan lēmumu par to pieņem pētījuma vadītājs. Piemērotas var būt arī urīnanalīzes. Informāciju par šiem parametriem sniegs dati par dzīvniekiem, kas izmantoti pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, kurš parasti ilgst 12 mēnešus (34. punkts). Papildu norādījumi par šādu paraugu ņemšanas vērtību kancerogenitātes pētījuma ietvaros ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ja ņem asins paraugus, tie jāievāc testa perioda beigās tieši pirms dzīvnieku nonāvēšanas procedūras vai tās laikā. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītas vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot. Izmeklēšanai var sagatavot arī asins uztriepes, it sevišķi, ja ir konstatējams, ka kaula smadzenes ir mērķorgāns, lai gan šāda asins uztriepju izmeklējuma vērtība kancerogēnā/onkogēnā potenciāla novērtēšanā kancerogenitātes posmā ir tikusi apšaubīta (38).

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

54. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem, izņemot indikatordzīvniekus (sk. 20. punktu) un citus satelītgrupas dzīvniekus, veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Indikatordzīvniekiem un citiem satelītgrupas dzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs). Orgānu svara noteikšana parasti neietilpst kancerogenitātes pētījumā, jo geriatriskas pārmaiņas un – vēlākā posmā – audzēju attīstība mazina orgānu svara datu lietderību. Tomēr orgānu svaru noteikt var būt ļoti svarīgi apliecinājuma nozīmes izvērtēšanā un pēc tā it sevišķi var spriest par iedarbības veidu. Ja orgānu svara noteikšana ietilpst satelītpētījumā, dati ir jāievāc ne vēlāk kā vienu gadu pēc pētījuma sākšanas.

55. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (40), ir jāsaglabā turpmāk sarakstā norādītie audi (kvadrātiekavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemdes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis

▼M4

Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemdes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranazālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezums un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārīgu aplikāciju ir jāsaglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (8) un šā pielikuma B.29. nodaļas (9) ieteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālo ievadīšanu.

Histopatoloģija

56. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (40). Ir jāizmeklē vismaz šādi audi:

— visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,

— visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,

— visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas, tostarp audzēji,

— ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas histopatoloģiskās pārmaiņas, tie paši audi ir jāizmeklē visu pārējo devu grupu dzīvniekiem,

— pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

▼M4

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA (KANCEROGENITĀTE UN HRONISKĀ TOKSICITĀTE)

Dati

57. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam novērota toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.

58. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralēlajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.

59. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (9. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.

60. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati,

— ķīmiskās vielas izcelsme,

— sērijas numurs,

— ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā.

▼M4

Testēšanas apstākļi:

— ievadīšanas ceļa un devu izvēles pamatojums,

— attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu,

— analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas ceļš un sīka informācija par ievadīšanu,

— inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajā devā,

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati)

Vispārīgi:

— izdzīvošanas dati,

— ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,

— barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,

— toksikokinētiskie dati, ja pieejami,

— oftalmoskopija (ja pieejama),

— hematoloģija (ja pieejama),

— klīniskā ķīmija (ja pieejama).

Klīniskie konstatējumi:

— toksicitātes pazīmes,

— visu anomāliju biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums),

— klīniski novērotas ietekmes veids, smagums un ilgums (pārejoša vai pastāvīga).

Autopsijas dati:

— ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,

— orgānu svars un to attiecības, ja vajadzīgs,

— autopsijas atrade; anomāliju biežums un smagums.

Histopatoloģija:

— histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, kas nav saistīti par neoplastiku,

— neoplastikas histopatoloģiskā atrade,

▼**M4**

— korelācijas starp makroskopisku un mikroskopisku atradi,

— visu ar ievadīšanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts, kurā ietverta arī smaguma klasifikācija,

— ziņojums par priekšmetstikliņu salīdzinošo izvērtēšanu.

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Komentāri par rezultātiem, arī:

— modelēšanas pieeju iztirzājums,

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— vēsturiskie kontroldati,

— apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,

— *BMD*, *NOAEL* vai *LOAEL* noteikšana,

— būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".

(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) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".

(10) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".

(11) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".

▼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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).

(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. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼B

B.34. **TOKSICITĀTES IETEKME UZ VIENAS PAAUDZES REPRODUKTĪVO FUNKCIJU**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. METODES BŪTĪBA

Vairākas grupas vīriešu un sieviešu kārtas dzīvnieku saņem pārbaudāmo vielu dažādās devās. Tēviņi to saņem augšanas stadijā un vismaz viena pilna spermatoģenēzes cikla laikā (kas pelēm ilgst apmēram 56 dienas un žurkām – 70 dienas), lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo ietekmi uz spermatoģenēzi.

Vecākpaaudzes (P) mātītes to saņem vismaz divu pilnu estrālo ciklu laikā, lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo ietekmi uz šo ciklu. Tad dzīvniekus pāro. Pārbaudāmo vielu pārošanās laikā saņem abu dzimumu dzīvnieki, bet vēlāk to saņem tikai mātītes grūtniecības un zīdīšanas laikā. Ja izmanto inhalācijas testu, metodei būs vajadzīgi pielāgojumi.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Nav.

1.6. METODES APRAKSTS

1.6.1. *Sagatavošanas darbi*

Veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Pārbaudāmo vielu ieteicams pievienot barībai vai dzeramajam ūdenim. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus. Pārbaudāmo vielu izmēģinājuma laikā visi dzīvnieki saņem pēc vienādas shēmas. Ja izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tie nav toksiski.

▼B

Vielu ievada septiņas dienas nedēļā.

1.6.2. *Izmēģinājumu dzīvnieki*

Dzīvnieku sugas izvēle

Parasti priekšroku dod žurkām vai pelēm. Izmanto veselus dzīvniekus, ar kuriem iepriekš nav veikti nekādi izmēģinājumi. Šim nolūkam neder dzīvnieku līnijas ar pazeminātu vaislību. Izmēģinājumu dzīvniekiem norāda sugu, līniju, dzimumu, svaru un/vai vecumu.

Pienācīgai reproduktīvo spēju novērtēšanai jāveic pētījumi ar abu dzimumu dzīvniekiem. Visus izmēģinājumu un kontroles dzīvniekus izmanto pēc atšķiršanas no mātes.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Katrā apstrādes un kontroles grupā jābūt pietiekamam dzīvnieku skaitam, lai iegūtu ap 20 grūsnām mātītēm pirmsatnešanās stadijā.

Šādā veidā var nodrošināt pietiekamā daudzumā grūsnas mātītes un mazuļus, lai varētu statistiski novērtēt vielas ietekmi uz P paaudzes dzīvnieku reproduktīvajām spējām, grūsnību un mātišķo dzīvnieku uzvedību, kā arī uz F_1 pēcnācēju zīšanu, augšanu un attīstību no aizmešanās līdz atšķiršanai.

1.6.3. Testa apstākļi

Barību un ūdeni dzīvnieki saņem *ad libitum*. Grūsnas mātītes īsi pirms atnešanās ievieto atsevišķos šim nolūkam paredzētos būros, vajadzības gadījumā nodrošina materiālu midzeņa ierīkošanai.

1.6.3.1. Izmantotās devas

Jābūt vismaz trim izmēģinājumu grupām un vienai kontroles grupai. Ja pārbaudāmo vielu ievada kopā ar šķīdinātāju, kontroles dzīvnieki saņem maksimālo izmantoto šķīdinātāja daudzumu. Ja pārbaudāmās vielas ietekmē samazinās uztura patēriņš vai tā uzņemšana organismā, var ieviest kontroles grupu, kas saņem līdzīgu uztura daudzumu. Ja to pieļauj pārbaudāmās vielas fizikālās/ķīmiskās vai bioloģiskās īpašības, jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska vecākdzīvniekiem (P), bet kas neveicina mirstību. Jāizvēlas tāda(-as) vidēji lielā(-ās) deva(-as), lai pārbaudāmās vielas izraisītā toksicitāte būtu minimāla, un tāda mazākā deva, lai tās kaitīgā ietekme uz vecākdzīvniekiem un pēcnācējiem nebūtu pamanāma. Ja pārbaudāmo vielu ievada ar zondes palīdzību vai kapsulās, tās deva jāizvēlas atkarībā no katra dzīvnieka ķermeņa svara un to katru nedēļu pielāgo ķermeņa svara izmaiņām. Devas, ko saņem mātītes grūsnības laikā, var aprēķināt pēc to ķermeņa svara tieši pirms izmēģinājuma vai grūsnības sestajā dienā.

1.6.3.2. Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja maztoksiska viela, kuras deva ir vismaz 1 000 mg/kg, nekādi neiespaido dzīvnieku reproduktīvās spējas, tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga. Ja iepriekšējie pētījumi rāda, ka lielākā deva izteikti toksiski iedarbojas uz mātītēm, bet negatīvi neietekmē auglību, tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga.

▼B

1.6.3.3. Testa norise

Aplikācijas shēma

Vecākpaaudzes (P) tēviņi sāk katru dienu saņemt pārbaudāmo vielu pēc atšķiršanas un vismaz pēc piecu dienu aklimatizēšanās, kad tie ir aptuveni 5–9 nedēļas veci. Žurkas turpina saņemt vielu 10 nedēļu laikā pirms pārošanās (peles – 8 nedēļas). Tēviņus nokauj un izmeklē tūlīt pēc pārošanās perioda beigām vai arī turpina tiem dot pārbaudāmo vielu, lai vajadzības gadījumā no tiem iegūtu vēl vienu metienu; tādā gadījumā tos nokauj un izmeklē īsi pirms izmēģinājuma beigām. Vecākpaaudzes (P) mātītes sāk saņemt pārbaudāmo vielu pēc vismaz piecu dienu aklimatizēšanās un turpina to saņemt vēl vismaz divas nedēļas pirms pārošanās. P mātītes turpina katru dienu saņemt vielu visā trīs nedēļu garajā pārošanās laikā, grūsnības laikā un vēlāk līdz F_1 pēcteču atšķiršanai. Vielas ievadīšanas shēmu var koriģēt, ja ir pieejama papildu informācija par pārbaudāmo vielu, piemēram, par tās metabolisko aktivāciju vai bioakumulāciju.

Dzīvnieku pārošana

Pētot toksicitātes ietekmi uz reproduktīvo funkciju, var izmantot pārošanas shēmu 1:1 (viens tēviņš un viena mātīte) vai 1:2 (viens tēviņš un divas mātītes).

Ja izmanto shēmu 1:1, mātīte paliek kopā ar tēviņu, līdz tā kļūst grūsna vai kamēr nav pagājušas trīs nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūtniecību sāk skaitīt no dienas, kad mātītei makstī konstatē embolu vai spermu.

Ja pārošanās neizdodas, dzīvniekus pārbauda, lai noteiktu varbūtējās neauglības cēloņus.

Var izmēģināt papildu pārošanos ar citu tēviņu, kura vaislība ir pierādīta, veikt reproduktīvo orgānu mikroskopisko izmeklēšanu, kā arī pārbaudīt estrālo ciklu vai spermatoģenēzi.

Metienu lielums

Pētot auglību pēc pārbaudāmās vielas aplikācijas, dzīvniekiem ļauj netraucēti laist pasaulē pēcnācējus un tos audzināt līdz atšķiršanas brīdim.

Ja tomēr jāsamazina mazuļu skaits metienā, to iesaka veikt šādi. Starp pirmo un ceturto dienu pēc atnešanās mazuļu skaitu katrā metienā var samazināt, pēc iespējas atstājot tajā četrus vīrišķos un četrus sievišķos mazuļus.

Ja vīrišķo un sievišķo mazuļu skaits neļauj atstāt pa četriem katra dzimuma īpatņiem katrā metienā, to var samazināt daļēji (piemēram, atstājot piecus tēviņus un trīs mātītes). Mazuļu skaitu nevar samazināt, ja metienā ir mazāk par astoņiem mazuļiem.

▼B

1.6.4. Dzīvnieku novērošana

Visu izmēģinājuma laiku katru dzīvnieku vismaz vienreiz dienā novēro. Reģistrē acīm redzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās gadījumus un toksiskuma pazīmes, kā arī nāves gadījumus. Pirms pārošanās un pārošanās laikā katru dienu var noteikt barības patēriņu. Pēc atnešanās, kā arī zīdīšanas laikā barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmo vielu pievieno dzeramajam ūdenim) ir jānosaka tajā pašā dienā, kad nosaka metiena svaru. P tēviņi un mātītes jānosver pirmajā vielas aplikācijas dienā un tad ik pēc nedēļas. Novērojumu rezultātus protokolē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

Grūtniecības ilgumu skaita no grūtniecības "nulles dienas". Katru metienu, tiklīdz iespējams, apskata uzreiz pēc atnešanās, reģistrējot mazuļu skaitu un dzimumu, nedzīvi piedzimušos, dzīvi piedzimušos un acīm redzamas anomālijas.

Nedzīvos mazuļus un mazuļus, kas nokauti ceturtajā dienā, uzglabā un pārbauda tiem iespējamos defektus. Dzīvos mazuļus pārskaita un visu metienu kopā, kā arī katru mazuli atsevišķi nosver nākamajā rītā pēc atnešanās, tad ceturtajā un septītajā dienā, bet vēlāk ik pēc nedēļas, kamēr turpinās izmēģinājums.

Mātītei un pēcnācējiem reģistrē visas novērotās kroplības vai uzvedības traucējumus.

1.6.5. Patoloģiskas izmaiņas

1.6.5.1. Autopsija

P paaudzes dzīvnieki pēc nokaušanas vai pēc nāves izmēģinājuma laikā makroskopiski jāizmeklē, reģistrējot jebkuras anatomiskas anomālijas vai patoloģiskas izmaiņas, īpašu uzmanību pievēršot reproduktīvās sistēmas orgāniem. Defektus meklē arī mirušiem un mirstošiem mazuļiem.

1.6.5.2. Histopatoloģija

Visiem P dzīvniekiem izņem un uzglabā olnīcas, dzemdi, maksti, sēkliniekus, sēklinieku piedēkļus, sēklas pūslīšus, priekšdziedzeri, koagulācijas dziedzeri, hipofīzi un mērķorgānu(-us) tālākai izmeklēšanai ar mikroskopu. Ja šie orgāni nav iepriekš izpētīti pēc vairākkārtējas devas ievadīšanas, tos mikroskopiski izmeklē visiem dzīvniekiem pēc lielākās devas aplikācijas un kontroles dzīvniekiem, kā arī izmēģinājuma laikā mirušiem dzīvniekiem, ja to var izdarīt.

Orgānus, kuros šiem dzīvniekiem novēro patoloģiskas izmaiņas, pārbauda arī visiem pārējiem P dzīvniekiem. Šajā gadījumā mikroskopiski jāizmeklē visi audi ar acīm redzamām patoloģiskām izmaiņām. Kā jau minēts iedaļā par dzīvnieku pārošanu, mikroskopiski var izmeklēt arī reproduktīvās sistēmas orgānus tiem dzīvniekiem, kuru auglība ir apšaubīta.

▼B

2. **DATI**

Datus var apkopot tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, auglīgo tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, patoloģisko izmaiņu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katra tipa izmaiņām.

Ja iespējams, visi skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispāratzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā suga/līnija,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī par reproduktīvajām spējām, grūtniecību un dzīvotspēju,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz paredzētajam nokaušanas brīdim vai līdz izmēģinājuma beigām,

— tabula, kurā norādīts katra metiena svars, mazuļu vidējais svars un atsevišķu mazuļu svars izmēģinājuma beigās,

— toksiska vai cita iedarbība uz reproduktīvajām spējām, pēcnācējiem un postnatālo attīstību,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— dati par P dzīvnieku ķermeņa svaru,

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. IZVĒRTĒJUMS UN INTERPRETĀCIJA

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

▼B

B.35. **DIVU PAAUDŽU REPRODUKTĪVĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO 416. (2001) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Šī divu paaudžu reprodukcijas testēšanas metode ir paredzēta vispārējās informācijas sniegšanai par testējamās vielas iedarbību uz vīrišķā un sievišķās reproduktīvās sistēmas integritāti un darbību, iekļaujot gonādu funkciju, estrālo ciklu, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, grūsnību, dzemdības, laktāciju un zīdīšanas pārtraukšanu, un pēcnācēju augšanu un attīstību. Pētījums var arī sniegt informāciju par testējamās vielas iedarbību uz jaundzimušo saslimstību un mirstību un provizoriskus datus par prenatālo un postnatālo ontoģenēzes toksicitāti un būt par metodisku līdzekli turpmākajos testos. Papildu F1 paaudzes augšanas un attīstības pētīšanai šī testa metode ir arī paredzēta vīrišķās un sievišķās reproduktīvās sistēmas integritātes un darbības, kā arī F2 paaudzes augšanas un attīstības novērtēšanai. Papildu informāciju par ontoģenēzes toksicitāti un funkcionāliem trūkumiem vai arī papildu pētījumu segmentus var iekļaut šajā protokolā, attiecīgi ievērojot ontoģenēzes toksicitātes un/vai ontoģenēzes neirotoksicitātes metodes, vai arī minētos beigu punktus var pētīt atsevišķos pētījumos, izmantojot piemērotas testu metodes.

1.2. TESTA METODES PRINCIPS

Testējamo vielu pakāpeniskās devās saņem vairākas grupas vīrišķā un sievišķā dzimuma dzīvnieku. P paaudzes vīrišķā dzimuma dzīvniekiem devas jāsaņem augšanas posmā un vismaz viena pilna spermatoģenēzes cikla laikā (kas pelēm ilgst apmēram 56 dienas un žurkām – 70 dienas), lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo iedarbību uz spermatoģenēzi. Iedarbību uz spermu nosaka ar vairākiem spermas rādītājiem (piemēram, spermas morfoloģiju un kustīgumu) un audu preparātā un sīki izstrādātā histopatoloģijā. Ja ir pieejami spermatoģenēzes dati no pietiekami ilga, piemēram, 90 dienu, iepriekšējā atkārtotās devas pētījuma, tad P paaudzes vīrišķā dzimuma dzīvnieki nav jāiekļauj vērtējumā. Tomēr ir ieteicams saglabāt P paaudzes spermas paraugus vai digitālos ierakstus, lai varētu novērtēt turpmāk. Lai varētu konstatēt kaitīgo iedarbību uz estrālā cikla normalitāti, P paaudzes sievišķā dzimuma dzīvniekiem testējamās vielas devas jāsaņem augšanas laikā un vairāku estrālo ciklu laikā. Testējamo vielu ievada vecāku (P) dzīvniekiem pārošanās laikā, radušās grūsnības laikā un līdz F1 pēcnācēju zīdīšanas pārtraukšanai. F1 pēcnācēji pēc zīdīšanas pārtraukšanas turpina saņemt testējamo vielu visu laiku, kamēr tie aug, pārojas un rada F2 pēcnācējus, līdz F2 pēcnācēju zīdīšanas pārtraukšanai.

Klīniskos novērojumus un patoloģiskās apskates visiem dzīvniekiem veic attiecībā uz toksiskuma pazīmēm ar īpašu uzsvaru uz iedarbību saistībā ar vīrišķās un sievišķās reproduktīvās sistēmas integritāti un darbību un uz pēcnācēju augšanu un attīstību.

▼B

1.3. TESTA METODES APRAKSTS

1.3.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Žurka ir vēlamākā testa suga. Ja izmanto citas sugas, ir jāsniedz pamatojums un ir nepieciešami attiecīgi pārlabojumi. Nav jāizmanto līnijas ar mazu auglību vai attīstības defektu labi zināmu lielu sastopamību. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt 20 % no vidējās svara, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

1.3.2. **Turēšanas un barošanas nosacījumi**

Eksperimenta dzīvnieku telpas temperatūrai jābūt 22 °C (± 30). Kaut arī relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un tam nav vēlams pārsniegt 70 %, izņemot telpas tīrīšanas laiku, mērķim jābūt 50–60 %. Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Attiecībā uz barošanu var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šo metodi.

Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viena dzimuma dzīvnieku grupās. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Pārotās mātītes pēc kopulācijas fakta būros tur atsevišķi dzemdību vai maternitātes būros. Pārotās žurkas var turēt arī mazās grupās un nošķirt vienu vai vairākas dienas pirms dzemdībām. Tuvojoties dzemdībām, pārotajiem dzīvniekiem nodrošina piemērotu un noteiktu migas veidošanas materiālu.

1.3.3. **Dzīvnieku sagatavošana**

Jāizmanto veseli, jauni dzīvnieki, kas ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz piecas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas izmēģinājuma procedūras. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un/vai vecumu. Ir jābūt zināmai brāļu un māsu radniecībai starp dzīvniekiem tā, lai izvairītos no brāļu un māsu pārošanas. Dzīvnieki pēc nejaušās izvēles ir jāiedala kontroles un vielas saņemšanas grupās (ieteicama stratifikācija pēc ķermeņa svara). Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Katram dzīvniekam piešķir unikālu identifikācijas numuru. Ar P paaudzi tas ir jāizdara pirms dozēšanas sākuma. Ar F1 paaudzes dzīvniekiem, kas atlasīti pārošanai, tas ir jāizdara pēc zīdīšanas pārtraukšanas. Reģistrācija, kas norāda izcelsmes metienu, ir jāizdara par visiem atlasītajiem F1 dzīvniekiem. Turklāt ir ieteicams iespējami drīz pēc dzimšanas mazuļus individuāli identificēt, ja apsver mazuļu individuālu svēršanu vai funkcionālos testus.

Dozēšanas sākumā vecāku (P) dzīvnieki ir aptuveni piecas līdz deviņas nedēļas veci. Visu testa grupu dzīvnieki, cik tas praktiski iespējams, ir viena svara un vecuma.

▼B

1.4. PROCEDŪRA

1.4.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katrā testa un kontroles grupā jābūt pietiekamam skaitam dzīvnieku, lai, vēlams, dzemdībās vai īsi pirms dzemdībām būtu vismaz 20 grūsni sievišķā dzimuma dzīvnieki. Ar vielām, kas izraisa nevēlamas ar vielas došanu saistītas iedarbības (piemēram, sterilitāti, pārlieku lielu toksicitāti pie lielas devas), tas varbūt nav iespējams. Mērķis ir nodrošināt pietiekamā daudzumā grūsnas mātītes, lai varētu statistiski novērtēt vielas spēju iedarboties uz auglību, grūsnību un mātišķo dzīvnieku uzvedību, kā arī F1 pēcnācēju zīšanu, augšanu un attīstību no apaugļošanās brīža līdz dzimumgatavībai un to pēcnācēju (F2) attīstību līdz zīdīšanas pārtraukšanai. Tādēļ nespēja iegūt grūsnu dzīvnieku pietiekamu skaitu (t. i., 20) obligāti nepadara pētījumu nederīgu un tas jāvērtē katrā gadījumā atsevišķi.

1.4.2. **Devu sagatavošana**

Ir ieteicams testējamo vielu ievadīt perorāli (ar barību, dzeramo ūdeni vai mākslīgi barojot), ja vien cits ievadīšanas veids (piemēram, caur ādu vai ieelpojot) nav uzskatāms par lietderīgāku.

Vajadzības gadījumā testējamo vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam apsvērt eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citos nesējos. Ir jābūt zināmām nesēju, kas nav ūdens, toksiskajām īpašībām. Ir jānosaka testējamās vielas stabilitāte nesējā.

1.4.3. **Dozēšana**

Izmanto vismaz trīs devu līmeņus un vienlaicīgu kontroli. Ja testējamās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība neierobežo, lielākās devas līmenis jāizvēlas ar nolūku izraisīt toksicitāti, bet ne nāvi vai smagas ciešanas. Negaidītas mirstības gadījumā vēl ir pieņemami pētījumi ar vecāku (P) dzīvnieku mirstību mazāku par aptuveni 10 procentiem. Lejupejoša devu līmeņu secība ir jāizraugās, lai parādītu ar dozēšanu saistīto iedarbību un nenovērojamas nelabvēlīgas ietekmes līmeni (*NOAEL*). Lejupejošo devu līmeņu noteikšanai bieži optimāli ir divkārši līdz četrkārši starplaiki, un ceturtās testa grupas pievienošana bieži ir vēlamāka nekā ļoti plašu starplaiku (piemēram, vairāk nekā 10 reizes) izmantošana starp dozēšanām. Barības pētījumos devu starplaikam jābūt ne lielākam par trīskāršu. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā esošos toksicitātes datus, jo īpaši atkārtotās devas pētījumu rezultātus. Jāņem vērā arī pieejamā informācija par testa savienojuma vai saistīto materiālu metabolismu un kinētiku. Turklāt minētā informācija arī palīdzēs parādīt dozēšanas režīma piemērotību.

▼B

Kontroles grupa ir vielu nesaņēmusi grupa vai nesēja kontroles grupa, ja testējamās vielas ievadīšanā izmanto nesēju. Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo vielu. Ja izmanto nesēju, kontroles grupa saņem lielāko izmantojamo nesēja tilpumu. Ja testējamo vielu ievada barībā un tā izraisa samazinātu barības uzņemšanu vai izmantošanu, tad var uzskatīt par vajadzīgu izmantot identiski barotu kontroles grupu. Vienlaicīgas identiski barotas kontroles grupas vietā var izmantot alternatīvus datus no kontrolētiem pētījumiem, kas paredzēti samazināta barības patēriņa iedarbībai uz reproduktīvajiem rādītājiem.

Jāņem vērā šādas nesēja un citu piedevu īpašības – iedarbība uz testējamās vielas uzsūkšanos, sadalījumu, metabolismu vai aizturi; iedarbība uz testējamās vielas ķīmiskajām īpašībām, kas var mainīt tās toksiskās īpašības; iedarbība uz dzīvnieku barības un ūdens patēriņu vai uz to barojuma statusu.

1.4.4. **Pieļaujamības tests**

Ja orālajā testā pie viena devas līmeņa, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, vai, ievadot ar barību vai dzeramo ūdeni, līdzvērtīgs procentuālais daudzums barībā vai dzeramajā ūdenī, izmantojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, nerodas novērojamas toksiskās iedarbības vecākiem vai to pēcnācējiem un ja toksicitāte nav sagaidāma, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā un/vai metaboliski radniecīgiem savienojumiem, tad pilnu pētījumu, izmantojot vairākus devu līmeņus var neuzskatīt par vajadzīgu. Pieļaujamības testu piemēro, izņemot gadījumu, ja iedarbība uz cilvēku rāda, ka jāizmanto augstāks orālās devas līmenis. Citiem ievadīšanas veidiem, tādiem kā inhalācija vai pielietošana uz ādas, fizikālās īpašības, tādas kā šķīdība, bieži var norādīt un ierobežot maksimālo sasniedzamo iedarbības līmeni.

1.4.5. **Devu ievadīšana**

Dzīvniekiem testējamā viela jādod septiņas dienas nedēļā. Vēlamākais ir perorālais ievadīšanas veids (barība, dzeramais ūdens vai mākslīgā barošana). Ja izmanto citu ievadīšanas veidu, jāsniedz pamatojums un var būt vajadzīgas attiecīgas izmaiņas. Visiem dzīvniekiem attiecīgā eksperimenta periodā devu dod ar vienu un to pašu metodi. Ja testējamo vielu ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara, izmantojot kuņģa zondi. Vienā reizē ievadītā šķidruma tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml/100 g ķermeņa svara (0,4 ml/100 g ir maksimums kukurūzas eļļai), izņemot ūdens šķīdumus, kad var izmantot 2 ml/100 g ķermeņa svara. Izņemot kairinošas vai kodīgas vielas, kam parasti ir saasinājuma iedarbība augstākās koncentrācijās, testa tilpuma izmaiņas ir jāsamazina līdz minimumam, pielāgojot koncentrāciju, lai nodrošinātu nemainīgu tilpumu visos devu līmeņos. Mākslīgās barošanas pētījumos mazuļi parasti testējamo vielu saņem tikai netieši ar pienu, līdz tiešā dozēšana sākas, izbeidzot zīdīšanu. Barības vai dzeramā ūdens pētījumos mazuļi papildus saņem testējamo vielu tieši, kad tie sāk paši ēst laktācijas perioda pēdējās nedēļas laikā.

▼B

Vielām, ko ievada ar barību vai dzeramo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, lai iesaistītie testējamās vielas daudzumi netraucētu normālo barības vai ūdens līdzsvaru. Ievadot testējamo vielu barībā var izmantot nemainīgu barības koncentrāciju (milj. daļas) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā uz ķermeņa svaru; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ievadot vielu ar mākslīgo barošanu, deva jādod katru dienu tajā pašā laikā un jāpielāgo vismaz reizi nedēļā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā uz dzīvnieka ķermeņa svaru. Pielāgojot mākslīgās barošanas devu, kas pamatojas uz ķermeņa svaru, ir jāņem vērā informācija par sadalījumu placentā.

1.4.6. **Eksperimenta grafiki**

Ikdienas dozēšana vecāku (P) tēviņiem un mātītēm sākas, kad tie ir piecas līdz deviņas dienas veci. Ikdienas dozēšana F1 tēviņiem un mātītēm sākas, izbeidzot zīdīšanu; jāievēro, ka testējamo vielu ievadot ar barību vai dzeramo ūdeni, testējamās vielas tieša iedarbība uz F1 mazuļiem var notikt jau laktācijas periodā. Dozēšanu abiem dzimumiem (P un F1) turpina vismaz 10 nedēļas pirms pārošanās perioda. Dozēšanu abiem dzimumiem turpina divas nedēļas pārošanās perioda laikā. Ja tēviņi vairs nav vajadzīgi reproduktīvo iedarbību vērtēšanai, tie humāni jānogalina un jāizpēta. Vecāku (P) mātītēm dozēšana jāturpina grūsnības laikā un līdz F1 pēcnācēju zīdīšanas pārtraukšanai. Jāapsver izmaiņas dozēšanas grafikā, pamatojoties uz pieejamo informāciju par testējamo vielu, iekļaujot esošos toksicitātes datus, metabolisma indukciju vai bioloģisko uzkrāšanos. Katra dzīvnieka deva parasti pamatojas uz jaunāko individuālā ķermeņa svara noteikšanu. Tomēr jābūt piesardzīgam, pielāgojot devu grūsnības pēdējā trešdaļā.

Devu došana P un F1 tēviņiem un mātītēm turpinās līdz eksperimenta izbeigšanai. Visi pieaugušie P un F1 tēviņi un mātītes humāni jānogalina, ja tie vairs nav vajadzīgi reproduktīvo iedarbību vērtēšanai. Pārošanai neizraudzītie F1 pēcnācēji un visi F2 pēcnācēji humāni jānogalina pēc zīdīšanas izbeigšanas.

1.4.7. **Pārošanas procedūra**

1.4.7.1. Vecāku (P) pārošana

Katrai pārošanai katru mātīti novieto ar viena un tā paša devas līmeņa tēviņu (1:1 pārošana), līdz notiek kopulācija vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru dienu mātītes apskata attiecībā uz spermas vai vagīnas embolu klātbūtni. Grūsnības 0. diena ir diena, kad konstatē vagīnas embolu vai spermu. Ja pārošanās ir neveiksmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas pārbaudītiem tēviņiem. Pāri skaidri jānorāda datos. Jāizvairās no brāļu un māsu pārošanas.

▼B

1.4.7.2. F1 pārošana

Lai radītu F2 paaudzi, no F1 pēcnācējiem pārošanai jāizvēlas, pārtraucot zīdīšanu, vismaz viens tēviņš un viena mātīte no katra metiena, lai pārotu ar citiem tā paša devas līmeņa, bet cita metiena mazuļiem. Ja metiena dzīvnieku nozīmīgas ķermeņa svara vai izskata atšķirības nav novērojamas, mazuļu izvēlei no katra metiena jābūt pēc nejaušās izvēles. Ja ir novērojamas atšķirības, jāizvēlas katra metiena labākie pārstāvji. Pragmatiski to vislabāk ir izdarīt, pamatojoties uz ķermeņa svaru, bet var būt lietderīgāk pamatoties uz izskatu. F1 pēcnācēji nav jāpāro, līdz tie sasnieguši pilnīgu seksuālo briedumu

Pāri bez pēcnācējiem ir jānovērtē, lai noteiktu neauglības cēloni. Tas var iekļaut tādas procedūras kā papildu pārošana ar citu pārbaudītu tēviņu vai mātīti, reproduktīvo orgānu mikroskopisko izmeklēšanu, kā arī estrālā cikla vai spermatoģenēzes pārbaudi.

1.4.7.3. Otrā pārošana

Dažos gadījumos, tādos kā ar vielas došanu saistītas metiena lieluma izmaiņas vai neskaidrs efekts pirmajā pārošanā, ir ieteicams P vai F1 pieaugušos dzīvniekus pārot vēlreiz, lai radītu otro metienu. Ir ieteicams mātītes vai tēviņus, kas nav radījuši metienu, atkārtoti pārot ar pretējā dzimuma pārbaudītiem vaislas dzīvniekiem. Ja otrā metiena radīšanu uzskata par nepieciešamu jebkurā paaudzē, dzīvnieki ir atkārtoti jāpāro vienu nedēļu pēc pēdējā metiena zīdīšanas pārtraukšanas.

1.4.7.4. Metiena lielums

Dzīvniekiem ļauj normāli dzemdēt un savus pēcnācējus audzināt līdz zīdīšanas pārtraukšanai. Metiena lielumu standartizēšana nav obligāta. Ja veic standartizāciju, izmantotā metode ir sīki jāapraksta.

1.5. NOVĒROJUMI

1.5.1. **Klīniskie novērojumi**

Vispārējie klīniskie novērojumi jāveic katru dienu un dozēšanas ar mākslīgo barošanu gadījumā novērojumu grafikā jāņem vērā iedarbību paredzamais maksimuma periods pēc dozēšanas. Jāreģistrē uzvedības izmaiņas, grūtu vai ilgu dzemdību pazīmes un visas toksicitātes pazīmes. Katra dzīvnieka papildu sīkāka apskate ir jāveic vismaz reizi nedēļā, un to ērti var izdarīt, kad dzīvnieku sver. Divreiz dienā un nedēļas nogalē attiecīgi vienreiz dienā visi dzīvnieki jānovēro attiecībā uz saslimstību un mirstību.

▼B

1.5.2. **Vecāku dzīvnieku ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš**

Vecāku dzīvniekus (P un F1) nosver pirmajā dozēšanas dienā un pēc tam reizi nedēļā. Vecāku sieviešu dzimuma dzīvniekus (P un F1) nosver vismaz grūsnības 0, 7., 14. un 20. vai 21. dienā un laktācijas laikā tajās pašās dienās, kad sver metienu, un dzīvnieku nogalināšanas dienā. Novērojumu rezultātus reģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku. Pirmspārošanas un grūsnības periodā barības patēriņu mēra vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo vielu ievada ar ūdeni, ūdens patēriņu mēra vismaz reizi nedēļā.

1.5.3. **Meklēšanās cikls**

Meklēšanās cikla ilgumu un normālību P un F1 mātītēm novērtē pēc vaginālajām iztriepēm pirms pārošanas un pēc izvēles pārošanās laikā, līdz ir atrastas pārošanās pazīmes. Iegūstot vagīnas/dzemdes kakla šūnas, jāpievērš uzmanība, lai izvairītos no gļotādas bojāšanas un sekojošas pseidogrūsnības ierosināšanas (1).

1.5.4. **Spermas rādītāji**

Visu P un F1 tēviņu sēklinieku un sēklinieku piedēkļu svaru reģistrē nogalinot un no katra orgāna vienu atstāj histopatoloģiskai izmeklēšanai (skatīt 1.5.7., 1.5.8.1. punktu). Katras P un F1 grupas tēviņu apakšgrupai, kurā ir vismaz desmit katras grupas tēviņu, atlikušie sēklinieki un sēklinieku piedēkļi ir attiecīgi jāizmanto pret homogenizāciju rezistento spermatīdu un *cauda epididymal* spermas rezervju skaitīšanai. Tai pašai tēviņu apakšgrupai sperma no *cauda epididymides* vai *vas deferens* jāsavāc spermas kustīguma un spermas morfoloģijas novērtēšanai. Ja ir novērota ar vielas došanu saistīta iedarbība vai ja ir citu pētījumu pierādījumi par iespējamo iedarbību uz spermatoģenēzi, spermas vērtēšana jāveic visiem tēviņiem katrā devas grupā; pretējā gadījumā skaitīšanu var ierobežot ar kontroles grupas un lielās devas P un F.1 tēviņiem.

Pret homogenizāciju rezistentās sēklinieku spermatīdas un *cauda epididymal* sperma ir jāskaita (2) (3). *Cauda spermas* rezerves var atvasināt no spermas koncentrācijas un tilpuma suspensijā, ko izmanto kvalitatīvo vērtējumu izdarīšanai, un no sekojošā atlikušo *cauda* audu malšanā un/vai homogenizācijā reģenerētās spermas skaita. Skaitīšanu izdara izraudzītajai visu devu grupu tēviņu apakšgrupai tūlīt pēc dzīvnieku nogalināšanas, ja vien netiek veikti video vai digitālie ieraksti vai paraugi nav sasaldējami un analizējami turpmāk. Tādos gadījumos kontroles grupu un lielākās devas grupu var analizēt pirmo. Ja nav novērojamas ar vielas došanu saistītas iedarbības (piemēram, iedarbība uz spermas skaitu, kustīgumu vai morfoloģiju), pārējo devu grupas nav jāanalizē. Ja lielākās devas grupā ir novērojamas ar vielas došanu saistītas iedarbības, ir jāvērtē arī mazāko devu grupas.

▼B

Epididimālās (vai *ductus deferens*) spermas kustīgums ir jānovērtē vai jāieraksta video tūlīt pēc nogalināšanas. Sperma jāreģenerē, samazinot bojājumus līdz minimumam, un jāatšķaida kustīguma analīzei, izmantojot pieņemamas metodes (4). Pieaugoši kustīgās spermas procentuālais daudzums jānosaka subjektīvi vai objektīvi. Ja veic kustīguma analīzi, izmantojot datoru (5) (6) (7) (8) (9) (10), pieaugošā kustīguma atvasināšana pamatojas uz lietotāja noteiktiem vidējā attāluma ātruma sliekšņiem un taisnumu vai lineāru koeficientu. Ja paraugus uzņem video (11) vai attēlus citādi reģistrē autopsijas laikā, var veikt vienīgi kontroles grupas un lielākās devas P un F.1 tēviņu analīzi, ja nav novērojamas ar vielas došanu saistītas iedarbības, pretējā gadījumā ir jāvērtē arī mazāko devu grupas. Ja nav videoattēla vai digitālā attēla, visi paraugi visās grupās ir jāanalizē autopsijā.

Jāizdara epididimālās (vai *vas deferens*) spermas morfoloģiskā vērtēšana. Sperma (vismaz 200 uz paraugu) ir jāapskata kā fiksēti mitri preparāti (12) un jāklasificē kā normāla vai nenormāla. Spermas morfoloģisko nenormālību piemēri iekļauj saplūšanu, izolētas galviņas un kroplīgas galviņas un/vai astes. Vērtēšana jāveic visu devu grupu izraudzītai tēviņu apakšgrupai tieši pēc nogalināšanas vai, pamatojoties uz video un digitālajiem ierakstiem, vēlāk. Iztriepes, kad tās ir fiksētas, arī var izskatīt vēlāk. Tādos gadījumos kontroles grupu un lielākās devas grupu var analizēt pirmo. Ja nav novērojamas ar vielas došanu saistītas iedarbības (piemēram, iedarbība uz spermas morfoloģiju), pārējo devu grupas nav jāanalizē. Ja lielākās devas grupā ir novērojamas ar vielas došanu saistītas iedarbības, ir jāvērtē arī mazāko devu grupas.

Ja kāds no iepriekš minētajiem spermas vērtēšanas rādītājiem jau ir apskatīts kā vismaz 90 dienu sistēmiskās toksicitātes pētījuma daļa, tie nav obligāti jāatkārto divu paaudžu pētījumā. Tomēr ir ieteicams saglabāt P paaudzes spermas paraugus vai digitālos ierakstus, lai vajadzības gadījumā veiktu turpmāku vērtēšanu.

1.5.5. **Pēcnācēji**

Katrs metiens ir jāapskata iespējami drīz pēc dzemdībām (0. laktācijas diena), lai konstatētu mazuļu skaitu un dzimumu, nedzīvi dzimušos, dzīvi dzimušos un makroskopisku anomāliju pastāvēšanu. Mazuļi, kas atrasti miruši 0. dienā, ja nav izmērcēti, vēlams, jāapskata attiecībā uz iespējamiem defektiem un nāves cēloni un jāsaglabā. Dzīvie mazuļi ir jāsaskaita un atsevišķi jānosver pēc dzimšanas (laktācijas 0. diena) vai 1. dienā un kārtējās svēršanas dienās pēc tam, piemēram, 4., 7., 14. un 21. laktācijas dienā. Mātītei un pēcnācējiem reģistrē visas novērotās fiziskās kroplības un uzvedības traucējumus.

▼B

Pēcnācēju fiziskā attīstība jāreģistrē galvenokārt pēc ķermeņa svara pieauguma. Citi fiziskie rādītāji (piemēram, ausu un acu atvēršanās, zobu parādīšanās, apmatojuma augšana) var dot papildu informāciju, bet minētos datus būtu vēlams vērtēt seksuālās nobriešanas kontekstā (piemēram, vecums un ķermeņa svars pie vagīnas atvēršanās vai balano–preputiālās atdalīšanās) (13). Ir ieteicami F1 pēcnācēju funkcionālie izmeklējumi (piemēram, kustību aktivitāte, sensorā funkcija, refleksu ontoģenēze) pirms un/vai pēc zīdīšanas pārtraukšanas, jo īpaši tie, kas saistās ar seksuālo nobriešanu, ja tādi izmeklējumi nav iekļauti atsevišķos pētījumos. Vecums, kad notiek vagīnas atvēršanās un preputiālā atdalīšanās, ir jānosaka no mātes nošķirtajiem F1 pēcnācējiem, kas izraudzīti pārošanai. Pēcdzemdību 0 dienā F2 mazuļiem ir jāmēra anogenitālais atstatums, ja mainījusies F1 dzimumu attiecība vai seksuālās nobriešanas laika iestāšanās.

Funkcionālos novērojumus var neizdarīt grupās, kas citādi uzrāda skaidras kaitīgo iedarbību pazīmes (piemēram, ievērojamu svara pieauguma samazināšanos utt.). Ja funkcionālos izmeklējumus izdara, tie nav jāizdara ar mazuļiem, kas izraudzīti pārošanai.

1.5.6. **Makroskopiskā autopsija**

Nogalināšanas vai nāves laikā pētījumā visus vecāku dzīvniekus (P un F1), visus mazuļus ar ārējām anomālijām vai klīniskām pazīmēm, kā arī vienu mazuli/dzimumu/metienu pēc nejaušās izvēles no F1 un F2 paaudzes apskata makroskopiski attiecībā uz strukturālām anomālijām vai patoloģiskām izmaiņām. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Mazuļi, kas ir humāni nogalināti mirstošā stāvoklī, un mirušie mazuļi, ja nav izmērcēti, ir jāapskata attiecībā uz iespējamiem defektiem un/vai nāves cēloni un jāsaglabā.

Visu pirmoreiz dzemdējušo mātīšu dzemdes ir jāapskata veidā, kas netraucē histopatoloģisko vērtēšanu, attiecībā uz implantācijas vietu klātbūtni un skaitu.

1.5.7. **Orgānu svars**

Nogalināšanas laikā visiem P un F1 vecāku dzīvniekiem jānosaka ķermeņa svars un jānosver šādi orgāni (pāru orgāni jānosver atsevišķi):

— dzemde, olnīcas,

— sēklinieki, *epididymides* (kopā un *cauda*),

— prostata,

— sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeriem un to šķidrumiem un prostatu (kā viena vienība),

— smadzenes, aknas, nieres, liesa, hipofīze, vairogdziedzeris un virsnieru dziedzeris un zināmie mērķa orgāni.

Ķermeņa svars pēc nogalināšanas jānosaka F1 un F2 mazuļiem, kas ir izraudzīti autopsijai. Jāsver šādi orgāni no viena nejauši izvēlēta mazuļa/dzimuma/metiena (skatīt 1.5.6. punktu) – smadzenes, liesa un timuss.

▼B

Makroskopiskās autopsijas un orgānu svara rezultāti jānovērtē kontekstā ar citu atkārtotās devas pētījumu rezultātiem, ja tādi ir pieejami.

1.5.8. **Histopatoloģija**

1.5.8.1. Vecāku dzīvnieki

Šādi vecāku dzīvnieku (P un F1) orgāni un audi vai to reprezentatīvi paraugi ir fiksējami un glabājami piemērotā vidē histopatoloģiskai apskatei:

— vagīna, dzemde ar kakliņu un olnīcām (glabājama piemērotā fiksatīvā),

— viens sēklinieks (glabājams Buina vai salīdzināmā fiksatīvā), viens *epididymis*, sēklas pūslīši, prostata un koagulācijas dziedzeris,

— iepriekš identificēts(-i) mērķa orgāns(-i) no visiem pārošanai izraudzītiem P un F1 dzīvniekiem.

Iepriekš uzskaitīto saglabāto orgānu un audu pilna histopatoloģiskā analīze jāizdara visiem lielākās devas un kontroles grupas P un F1 dzīvniekiem, kas izraudzīti pārošanai. P dzīvnieku olnīcu apskate nav obligāta. Orgāni, kuros parādās ar vielas došanu saistītas izmaiņas, ir jāapskata arī mazās un vidējās devas grupās, lai palīdzētu *NOAEL* noskaidrošanā. Turklāt histopatoloģisko novērtēšanu veic mazas un vidējas devas dzīvniekiem, kuriem ir domājama samazināta auglība, piemēram, tādiem, kas nav pārojušies, apaugļojušies, radījuši pēcnācējus vai dzemdējuši veselus pēcnācējus vai kuriem ir ietekmēts meklēšanās cikls vai spermas skaits, kustīgums vai morfoloģija. Jāapskata visi makroskopiskie bojājumi, tādi kā atrofija vai audzēji.

Lai identificētu ar vielas došanu saistītas iedarbības, tādas kā saglabātas spermatīdas, trūkstoši dīgļa šūnu slāņi vai tipi, daudzkodolu gigantiskās šūnas vai spermatogēno šūnu nekrotizēšanās lūmenā, ir jāveic sīka sēklinieku histopatoloģiskā apskate (piemēram, izmantojot Buina fiksatīvu, iegremdēšanu parafīnā un 4–5 μm biezus šķērsvirziena griezumus) (14). Neskarta *epididymis* apskatē jāiekļauj *caput*, *corpus* un *cauda*, apskati var izdarīt, novērtējot garengriezumu. *Epididymis* jānovērtē attiecībā uz leikocītu infiltrāciju, pārsvarā esošo šūnu tipu izmaiņām, šūnu tipiem ar novirzēm no normas un spermas fagocitozi. Tēviņu reproduktīvo orgānu izmeklēšanai var izmantot perjodskābes Šifa reakciju un iekrāsošanu ar hematoksilīnu.

Pēclaktācijas olnīcām jāsatur aizmetņu un augošas olšūnas, kā arī lieli laktācijas *corpora lutea*. Histopatoloģiskajai apskatei jākonstatē aizmetņu olšūnu populācijas kvalitatīva sarukšana. Aizmetņu olšūnu kvantitatīvu novērtēšanu veic F1 mātītēm; dzīvnieku skaitam, olnīcu griezumu izvēlei un autopsijas parauga lielumam jābūt statistiski atbilstošam izmantojamai vērtēšanas procedūrai. Apskatē jāiekļauj aizmetņu olšūnu skaitīšana, tās var apvienot ar mazām augošām olšūnām vielu saņēmušo un kontroles grupas olšūnu salīdzināšanai (15) (16), (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. No mātes atšķirtie mazuļi

Makroskopiski nenormālus audus un mērķa orgānus no visiem mazuļiem ar ārējām anomālijām vai klīniskajām pazīmēm, kā arī no viena pēc nejaušās izvēles izraudzīta mazuļa/dzimuma/metiena no F1 un F2 paaudzes, kas nav bijis izraudzīts pārošanai, fiksē un glabā piemērotā vidē histopatoloģiskai apskatei. Saglabāto audu pilna histopatoloģiskā raksturošana jāizdara ar īpašu uzsvaru uz reproduktīvās sistēmas orgāniem.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Par katru testa grupu un katru paaudzi datus reģistrē atsevišķi un apkopotus tabulas veidā – parādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, dzīvnieku skaitu, kas atrasti miruši testa laikā vai nogalināti humānu apsvērumu dēļ, katras nāves vai humānās nogalināšanas laiku, auglīgo dzīvnieku skaitu, grūsno mātīšu skaitu, dzīvnieku skaitu, kam ir toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, iekļaujot toksisko iedarbību sākuma laiku, ilgumu un stiprumu, vecāku un pēcnācēju novērojumu veidu, histopatoloģisko izmaiņu veidu un visus attiecīgos metienu datus.

Skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu vispārpieņemtu statistikas metodi, statistikas metodes jāizvēlas kā daļa no pētījuma projekta un ir jāpamato. Datu analīzei var būt noderīgi devas–atbildes reakcijas statistiskie modeļi. Pārskatā jāiekļauj pietiekami daudz informācijas par izmantoto analīzes metodi un datorprogrammu tā, lai neatkarīgs pārbaudītājs/statistiķis varētu no jauna novērtēt un atjaunot analīzi.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA

Šā divu paaudžu reproduktīvās toksicitātes pētījuma konstatācijas jānovērtē novēroto iedarbību izteiksmē, iekļaujot autopsiju un mikroskopiskos izmeklējumus. Vērtējumā iekļauj testējamās vielas devas saistība ar anomāliju – iekļaujot makroskopiskos bojājumus, identificētos mērķa orgānus, ietekmēto auglību, klīniskās anomālijas, ietekmēto reproduktīvo un metiena rezultātu, ķermeņa svara izmaiņas, iedarbību uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – to klātbūtni vai to neparādīšanos, biežumu un smagumu. Novērtējot testa rezultātus, jāņem vērā testējamās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības un toksikokinētiskie dati, ja tie pieejami.

Pareizi veiktam reproduktīvās toksicitātes testam jādod apmierinošs nenovērojamas kaitīgas iedarbības līmeņa novērtējums un izpratne par kaitīgām iedarbībām uz vairošanos, dzemdībām, laktāciju, postnatālo attīstību, iekļaujot augšanu un seksuālo attīstību.

▼B

2.3. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Divu paaudžu reproduktīvās toksicitātes pētījums sniedz informāciju par vielas atkārtotas iedarbības ietekmi visās reproduktīvā cikla fāzēs. Jo īpaši pētījums sniedz informāciju par reproduktīvajiem rādītājiem un par pēcnācēju attīstību, augšanu, briedumu un izdzīvošanu. Pētījuma rezultāti jāinterpretē saistībā ar subhronisko, prenatālās attīstības, toksikokinētisko un citu pieejamo pētījumu rezultātiem. Šā pētījuma rezultātus var izmantot, novērtējot ķīmiskās vielas turpmāku pētījumu vajadzību. Rezultātu ekstrapolācija uz cilvēka pētījumu ir derīga ierobežotā veidā. Tie vislabāk izmantojami, lai sniegtu informāciju par nelabvēlīgas ietekmes līmeņiem un pieļaujamo iedarbību uz cilvēku (20) (21) (22) (23).

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati,

— tīrība.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība, materiāls migas ierīkošanai utt.,

— dzīvnieku individuālais svars testa sākumā.

Testa apstākļi:

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīki dati par testējamās vielas preparāta/barības pagatavošanu, sasniegtās koncentrācijas,

— preparāta stabilitāte un viendabīgums,

— sīki dati par testējamās vielas ievadīšanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās vielas koncentrācijas (milj. daļas) barībā/dzeramajā ūdenī pārvēršana sasniegtajā devā (mg/kg ķermeņa svara dienā),

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti.

▼B

Rezultāti:

— barības patēriņš un, ja pieejams, ūdens patēriņš, barības efektivitāte (ķermeņa svara palielinājums uz patērētās barības gramu) un testējamā materiāla patēriņš P un F1 dzīvniekiem, izņemot kopā turēšanas periodu un vismaz laktācijas pēdējo trešdaļu,

— uzsūkšanās dati (ja pieejami),

— pārošanai izraudzīto P un F1 dzīvnieku ķermeņa svara dati,

— metiena un mazuļu svara dati,

— ķermeņa svars nogalinot, un vecāku dzīvnieku absolūtā un relatīvā svara dati,

— klīnisko pazīmju veids, smagums un ilgums (atgriezeniskas vai neatgriezeniskas),

— nāves laiks pētījuma laikā vai arī dzīvnieki izdzīvojuši līdz nogalināšanai,

— toksiskās atbildes reakcijas dati pēc dzimuma un devas, iekļaujot pārošanās, auglības, grūsnības, dzimšanas, dzīvotspējas un laktācijas indeksus; pārskatā jānorāda skaitļi, kas izmantoti minēto indeksu aprēķināšanā,

— toksiskās vai citas iedarbības uz reproduktīvo funkciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— P un F1 mātīšu skaits, kurām ir normāls cikls un cikla ilgums,

— kopējais *cauda epididymal* spermas skaits, pieaugoši kustīgās spermas procentuālais daudzums, morfoloģiski normālās spermas procentuālais daudzums un spermas ar katru identificētu nenormālību procentuālais daudzums,

— laiks līdz pārošanai, iekļaujot dienu skaitu līdz pārošanai,

— grūsnības ilgums,

— implantāciju un *corpora lutea* skaits, metiena lielums,

— dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudumi,

— mazuļu skaits ar makroskopiski redzamām anomālijām, ja ir noteikts nīkuļu skaits, kuri jāreģistrē,

— dati par mazuļu fiziskām atšķirības iezīmēm un citi postnatālās attīstības dati; novērtētas fiziskās atšķirības iezīmes ir jāpamato,

— funkcionālo novērojumu dati attiecīgi par mazuļiem un pieaugušajiem,

— attiecīgā gadījumā statistiskās apstrādes rezultāti.

▼B

Rezultātu apspriešana.

Secinājumi, iekļaujot *NOAEL* vērtības ietekmes uz māti un pēcnācējiem.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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. Reproductive Toxicology 5:39; p. 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). 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. Reproductive 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, p. 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). Computerised 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, p. 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 C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. 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) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼**M4**

B.36. **TOKSIKOKINĒTIKA**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 417 (*TG*) (2010. gads). Pētījumus, kuros izmeklē testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētiku, veic, lai iegūtu pietiekamu informāciju par šīs vielas absorbciju, izplatīšanos, biotransformāciju (t. i., metabolismu) un ekskrēciju nolūkā sasaistīt koncentrāciju vai devu ar novēroto toksicitāti un izprast toksicitātes mehānismu. Toksikokinētika var palīdzēt izprast toksikoloģiskos pētījumus, parādot, ka testa dzīvnieki tiek sistemātiski pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai, un atklājot, kuras ir cirkulējošās molekulārās struktūrdaļas (ķīmiskā pamatviela / metabolīti). Šajos pētījumos noteiktie toksikokinētiskie pamatparametri arī sniegs informāciju par testējamās ķīmiskās vielas iespējamu akumulēšanos audos un/vai orgānos un iespējamu biotransformācijas inducēšanos testējamās ķīmiskās vielas iedarbības rezultātā.

2. Toksikokinētikas dati var palīdzēt novērtēt, cik pietiekami un būtiski dzīvnieku toksicitātes dati ir ekstrapolēšanai uz novērtējumu par apdraudējumu un/vai risku cilvēkam. Turklāt toksikokinētikas pētījumi var dot informāciju, kas noder, lai noteiktu devu līmeņus toksicitātes pētījumiem (lineārā kinētika attiecībā pret nelineāro kinētiku), ievadīšanas ceļa ietekmi un biopieejamību un lai noskaidrotu jautājumus, kas saistīti ar pētījuma plānu. Dažu veidu toksikokinētikas datus var izmantot uz fizioloģiju pamatota toksikokinētikas (*PBTK*) modeļa izstrādē.

3. Metabolītu/toksikokinētikas datiem ir svarīga nozīme, piemēram, tie var norādīt uz iespējamo toksicitāti un iedarbības veidiem, kā arī uz to sakaru ar devas līmeni un ekspozīcijas ceļu. Turklāt metabolisma dati var sniegt informāciju, kas var noderēt, lai novērtētu, cik toksikoloģiski būtiska ir eksogēni radušos testējamās ķīmiskās vielas metabolītu iedarbība.

4. Attiecīgi toksikokinētikas dati palīdzēs pamatot struktūras un aktivitātes kvantitatīvo sakarību un analoģijas principa jeb grupēšanas pieejas turpmāko pieņemamību un piemērojamību ķīmisko vielu drošuma izvērtēšanā. Kinētikas dati var noderēt, arī lai izvērtētu citu pētījumu (piemēram, *in vivo*/*in vitro*) toksikoloģisko būtiskumu.

5. Ja vien nav minēts cits ievadīšanas ceļš (sk. 74.–78. punktu), šī testēšanas metode ir piemērojama testējamās ķīmiskās vielas orālai ievadīšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Regulatīvajām sistēmām ir dažādas prasības un vajadzības attiecībā uz to beigupunktu un parametru mērīšanu, kas saistīti ar dažādu kategoriju ķīmisko vielu (piemēram, pesticīdu, biocīdu, rūpniecisko ķīmisko vielu) toksikokinētiku. Pretēji lielākajai daļai testēšanas metožu šajā testēšanas metodē ir paredzēta ar vairākiem mērījumiem vai beigupunktiem saistīta toksikokinētiskā testēšana. Nākotnē var tikt izstrādāti viens vai vairāki jauni testēšanas metožu apraksti un/vai norādījumu dokumenti, lai katru beigupunktu aprakstītu atsevišķi un detalizētāk. Šīs testēšanas metodes gadījumā veicamie testi vai novērtējumi ir atkarīgi no katras regulatīvās sistēmas prasībām un/vai vajadzībām.

▼M4

7. Ir vairāki pētījumi, ko var veikt, lai regulatīvām vajadzībām izvērtētu testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētiskās īpašības. Tomēr atkarībā no konkrētajām regulatīvajām vajadzībām vai situācijām ne visi no šiem iespējamiem pētījumiem var būt vajadzīgi, lai izvērtētu testējamo ķīmisko vielu. Toksikokinētikas pētījumu plānošanā jārīkojas elastīgi, ņemot vērā pētītās testējamās ķīmiskās vielas īpašības. Dažos gadījumos, lai novērtētu ar testējamo ķīmisko vielu saistīto apdraudējumu un riskus, var būt jāizpēta tikai kāds atsevišķs jautājumu kopums. Dažkārt toksikokinētikas datus var vākt citu toksikoloģisku pētījumu izvērtēšanas ietvaros. Savukārt citos gadījumos atkarībā no regulatīvajām vajadzībām un/vai no jauniem jautājumiem, kas rodas testējamās ķīmiskās vielas izvērtēšanas laikā, var būt vajadzīgi papildu un/vai plašāki toksikokinētikas pētījumi.

8. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un izvairītos no nevajadzīgas dzīvnieku izmantošanas, pirms pētījuma veikšanas testēšanas laboratorijai ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu un attiecīgajiem metabolītiem un to analogiem. Tas varētu ietvert datus, kas iegūti ar citām attiecīgām testēšanas metodēm (*in vivo* pētījumiem, *in vitro* pētījumiem un/vai *in silico* izvērtējumiem). Pētījuma plānošanā un rezultātu interpretēšanā var noderēt ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības, piemēram, oktanola/ūdens sadalījuma koeficients (kas izteikts kā log P_{OW}), pKa, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens un molekulmasa. Šīs īpašības var noteikt, izmantojot attiecīgas metodes, kā aprakstīts attiecīgajās testēšanas metodēs.

IEROBEŽOJUMI

9. Šī testēšanas metode nav izstrādāta īpašiem apstākļiem, piemēram, grūsniem vai zīdošiem dzīvniekiem vai mazuļiem, vai lai izvērtētu iespējamās atliekas eksponētos produktīvajos dzīvniekos. Tomēr pētījumā ar B.36 iegūtie dati var dot pamatinformāciju, ko var izmantot, plānojot konkrētus pētījumus šo jautājumu noskaidrošanai. Šī testēšanas metode nav paredzēta nanomateriālu testēšanai. Ziņojumā par ESAO testēšanas norādījumu provizorisko pārskatīšanu attiecībā uz to piemērojamību nanomateriāliem ir norādīts, ka *TG* 417 (kas ir līdzvērtīgi B.36. testēšanas metodei) nanomateriāliem piemērot nedrīkst (1).

DEFINĪCIJAS

10. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas papildinājumā.

DZĪVNIEKU LABTURĪBAS APSVĒRUMI

11. Norādījumi par humānu attieksmi pret dzīvniekiem ir pieejami ESAO Norādījumu dokumentā (*GD*) Nr. 19 (2). Attiecībā uz visiem šajā testēšanas metodē aprakstītajiem *in vivo* un *in vitro* pētījumiem ieteicams izmantot ESAO *GD 19*.

METOŽU APRAKSTS

Ievadpētījumi

12. Lai noteiktu toksikokinētikas pētījumu eksperimentālos parametrus (piemēram, metabolismu, masas bilanci, analītiskās procedūras, devas noteikšanu, CO_2 izgarojumus utt.), ir ieteicams un vēlams izmantot ievadpētījumus. Dažu šo parametru noteikšana var nozīmēt, ka nav vajadzīgs izmantot radioaktīvi iezīmētas ķīmiskās vielas.

▼M4

Dzīvnieku izvēle

Sugas

13. Toksikokinētikas testos ieteicams izmantot tās pašas dzīvnieku sugas (un līniju), ko izmanto citos toksikoloģiskos pētījumos ar interesējošo testējamo ķīmisko vielu. Parasti jāizmanto žurkas, jo tās toksikoloģiskos pētījumos jau tiek plaši izmantotas. Citas vai papildu sugas var būt pamats izmantot tad, ja svarīgi toksikoloģiski pētījumi apliecina šīm sugām būtisku toksicitāti vai ja ir pieejamas liecības, ka to toksicitāte/toksikokinētika uz cilvēku ir vairāk attiecināma. Dzīvnieku sugas un līnijas izvēle ir jāpamato.

14. Ja vien nav minēts citādi, šajā testēšanas metodē testējamā suga ir žurka. Lai izmantotu citas testējamās sugas, var būt vajadzīgs grozīt dažus metodes aspektus.

Vecums un līnija

15. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki (parasti devu ievadīšanas brīdī 6–12 nedēļas veci) (sk. arī 13. un 14. punktu). Ja izmanto dzīvniekus, kas nav jauni pieauguši dzīvnieki, tas jāpamato. Pētījuma sākumā visiem dzīvniekiem jābūt vienādā vecumā. Atsevišķu dzīvnieku svara atšķirības nedrīkst pārsniegt ± 20 % no testa grupas dzīvnieku vidējā svara. Vislabāk ir izmantot to pašu līniju, kas izmantota testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskās datubāzes izveidē.

Dzīvnieku skaits un dzimums

16. Katrai testētajai devai jāizmanto vismaz četri viena dzimuma dzīvnieki. Izmantoto dzīvnieku dzimums jāpamato. Ja ir pamats uzskatīt, ka pastāv būtiskas ar dzimumu saistītas toksicitātes atšķirības, jāapsver, vai neizmantot abus dzimumus (četrus tēviņus un četras mātītes).

Turēšanas un barošanas apstākļi

17. Testa periodā dzīvnieki parasti ir jātur atsevišķi. Īpašos apstākļos var būt pamatota turēšana grupā. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C), savukārt relatīvajam mitrumam jābūt 30–70 %. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim.

Testējamā ķīmiskā viela

18. Visos pētījuma masas bilances un metabolītu noteikšanas aspektos ir jāizmanto ar ^{14}C radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela; tomēr, ja var pierādīt, ka:

— masas bilanci un metabolītus var pienācīgi noteikt, izmantojot neiezīmētu testējamo ķīmisko vielu,

— ar neradioaktīvu testējamo ķīmisko vielu izmantotās metodes analītiskais specifiskums un jutīgums ir vienlīdzīgs ar vai lielāks par to, ko varētu sasniegt ar radioaktīvi iezīmētu testējamo ķīmisko vielu,

▼M4

radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela nav jāizmanto. Turklāt var izmantot citus radioaktīvus un stabilus izotopus, it sevišķi, ja šis elements ir atbildīgs par testējamās ķīmiskās vielas toksisko daļu vai tajā ietilpst. Ja iespējams, radioaktīvi iezīmētajam atomam ir jāatrodas molekulas pamatdaļā, kas ir metaboliski stabila (nepiedalās apmaiņās, nav metaboliski noārdāma līdz CO_2 un nekļūst par daļu no organisma vienoglekļa krājuma). Lai varētu izsekot testējamās ķīmiskās vielas metaboliskajai apritei, var būt vajadzīgs iezīmēt vairākas molekulas vietas vai konkrētus rajonus.

19. Radioaktīvi iezīmētās un neiezīmētās testējamās ķīmiskās vielas ir ar attiecīgām metodēm jāanalizē, lai noteiktu to tīrību un identitāti. Radioaktīvas testējamās ķīmiskās vielas radioaktīvajai tīrībai jābūt augstākajai, kāda attiecīgajai testējamajai ķīmiskajai vielai ir sasniedzama (vēlams. augstākai par 95 %), un iespēju robežās jācenšas noteikt piemaisījumus, kuru saturs ir 2 % un vairāk. Tīrība, kā arī visu konstatēto piemaisījumu identitāte un saturs ir jānorāda ziņojumā. Atsevišķas regulatīvas programmas var sniegt papildu norādījumus, kas palīdzētu definēt un specificēt ķīmiskas vielas, kuras ir maisījumi, un aprakstīt metodes, kā noteikt tīrību.

Devu izvēle

Ievadpētījums

20. Parasti ievadpētījumam pietiek ar vienreizēju orālu devu. Devai jābūt netoksiskai, bet pietiekami augstai, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus, kā arī lai sasniegtu noteikto ievadpētījuma mērķi, kā norādīts šīs testēšanas metodes 12. punktā.

Galvenie pētījumi

21. Galvenajiem pētījumiem ir vēlams izmantot vismaz divas devas, jo no vismaz divām devu grupām ievāktā informācija var palīdzēt noteikt devas citiem toksicitātes pētījumiem, kā arī novērtēt devas un atbildes reakcijas sakarības jau pieejamos toksicitātes testos.

22. Ja tiek ievadītas divas devas, abām devām jābūt pietiekami augstām, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus. Izvēloties devas, jāņem vērā informācija, kas iegūstama no jau pieejamajiem toksicitātes datiem. Ja informācija (piemēram, no akūtās orālās toksicitātes pētījumiem, kuros reģistrētas toksicitātes klīniskās pazīmes, vai no atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem) nav pieejama, augstākajai devai varbūt var izmantot vērtību, kas nepārsniedz aplēsto LD_{50} (orālai ievadīšanai un ārīgai aplikācijai) vai LC_{50} (inhalācijai) vai kas nepārsniedz aplēstā akūtās toksicitātes diapazona zemāko vērtību. Zemākajai devai jābūt kādai daļai no augstākās devas.

23. Ja tiek pētīts tikai viens devas līmenis, devai vēlams būt pietiekami augstai, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus, neradot acīmredzamu toksicitāti. Jāpamato, kāpēc nav paredzēts otrs devas līmenis.

24. Ja ir jānosaka devas ietekme uz kinētiskajiem procesiem, ar divām devām var nepietikt un vismaz vienai devai jābūt pietiekami augstai, lai šos procesus piesātinātu. Ja apgabals zem līknes, kas raksturo koncentrāciju plazmā un laiku (*AUC*) starp diviem galvenajā pētījumā izmantotajiem devu līmeņiem nav lineārs, ļoti iespējams, ka vienam vai vairākiem kinētiskajiem procesiem kaut kur starp šiem diviem devu līmeņiem iestājas piesātinājums.

▼M4

25. Testējamām ķīmiskām vielām ar zemu toksiskumu ir jāizmanto maksimālā deva 1 000 mg uz kg ķermeņa svara (orālai ievadīšanai un ārīgai aplikācijai) (ja vielu ievada ar inhalāciju, sk. šā pielikuma B.2. nodaļu; parasti šī deva nepārsniegtu 2 mg/l). Attiecībā uz konkrētām ķīmiskām vielām no regulatīvām prasībām var izrietēt augstākas devas. Devu izvēle vienmēr ir jāpamato.

26. Lai noteiktu akumulācijas un/vai noturības potenciālu, var pietikt ar datiem par vienreizējas devas toksikokinētiku un izplatīšanos audos. Tomēr dažos gadījumos var būt vajadzīga atkārtotu devu ievadīšana, i) lai pilnīgāk izpētītu akumulācijas un/vai noturības potenciālu vai toksikokinētiskas pārmaiņas (t. i., piemēram, enzīmu indukcija un inhibīcija) vai ii) ja to paredz piemērojamā regulatīvā sistēma. Pētījumos ar atkārtotām devām parasti pietiek ar atkārtotas zemas devas ievadīšanu, taču dažos gadījumos var būt arī vajadzīga atkārtotas augstas devas ievadīšana (sk. arī 57. punktu).

Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

27. Testējamā ķīmiskā viela ir homogēni jāizšķīdina vai jāsuspendē tajā pašā nesējvielā, kas izmantota pārējiem orālās (ar mākslīgo barošanu) toksicitātes pētījumiem ar testējamo ķīmisko vielu, ja šāda informācija par nesējvielu ir pieejama. Nesējvielas izvēle jāpamato. Nesējviela un devas tilpums ir jāizvēlas, pētījumu plānojot. Parasti ievadīšanu veic ar mākslīgo barošanu, taču noteiktās situācijās piemērotāka var būt ievadīšana ar želatīna kapsulu vai ar piejaukumu barībai (abos gadījumos tas jāpamato). Ir jāpārbauda un jānorāda katram dzīvniekam faktiski ievadītā deva.

28. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā ievada ar mākslīgo barošanu, ir atkarīgs no testa dzīvnieku lieluma, devas nesējvielas veida un no tā, vai pirms testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas dzīvniekus baro vai nebaro. Jāpamato barības došana vai ierobežošana pirms devu došanas. Parasti gan ūdens, gan neūdens nesējvielu gadījumā tilpumam jābūt iespējami mazākam. Grauzējiem devu tilpumam parasti nevajadzētu pārsniegt 10 ml uz kg ķermeņa svara. To nesējvielu tilpums, ko izmanto lipofīlākām testējamām ķīmiskām vielām, var būt no 4 ml uz kg ķermeņa svara. Atkārtotajām devām, kuru gadījumā nebūtu ieteicams dzīvniekiem dienām ilgi ierobežot uzturu, jāapsver mazāki devu tilpumi (piemēram, 2–4 ml uz kg ķermeņa svara). Kad iespējams, jāapsver iespēja izmantot devas tilpumu, kas atbilst tilpumam, kuru ievadīja citos orālās (ar mākslīgo barošanu) toksicitātes pētījumos ar testējamo ķīmisko vielu.

29. Lai noteiktu biopieejamību vai relatīvo orālo absorbciju, var izmantot testējamās ķīmiskās vielas intravenozu ievadīšanu un testējamās ķīmiskās vielas mērīšanu asinīs un/vai ekskrētā. Intravenozajam pētījumam testējamās ķīmiskās vielas vienreizēju devu (parasti tā ir vienāda ar zemāko orāli ievadīto devu, bet to nepārsniedz, sk. devu izvēli) ievada, izmantojot piemērotu nesējvielu. Šis materiāls ir jāievada piemērotā tilpumā (piemēram, 1 ml uz kg ķermeņa svara) izraudzītajā ievadīšanas vietā vismaz četriem attiecīga dzimuma dzīvniekiem (ja nepieciešams, var izmantot abus dzimumus, sk.

▼M4

16. punktu). Testējamās ķīmiskās vielas intravenozai ievadīšanai ir vajadzīgs pilnībā izšķīdināts vai suspendēts devas preparāts. Intravenozās ievadīšanas nesējvielai nevajadzētu ietekmēt asins sastāvu vai asins plūsmu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar infūziju, infūzijas ātrums ir jānorāda ziņojumā un jāstandartizē starp dzīvniekiem – ja tiek izmantots infūzijas sūknis. Ja kanula testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai un/vai asins ņemšanai tiek ievietota jūga vēnā vai ja ievadīšanai tiek izmantota femorālā artērija, ir jāizmanto anestēzija. Anestēzijas veids ir pienācīgi jāapsver, jo tas var ietekmēt toksikokinētiku. Pirms tiek ievadīta testējamā ķīmiskā viela kopā ar nesējvielu, dzīvniekiem ir jāļauj pienācīgi atgūties.

30. Dažām testējamām ķīmiskām vielām, ņemot vērā to fizikālķīmiskās īpašības, kā arī paredzamo izmantošanu vai iedarbību uz cilvēku, var būt izmantojami citi ievadīšanas ceļi, piemēram, ārīga aplikācija un inhalācija (sk. 74.–78. punktu).

Mērījumi

Masas bilance

31. Masas bilanci nosaka, ievadītās (radioaktīvās) devas procentuālo daļu, kas izdalījusies ar urīnu, ekskrementiem un izelpoto gaisu, summējot ar procentuālo daļu, kas ir audos, līķa pārējā daļā un būra mazgājamā ūdenī (sk. 46. punktu). Parasti par pietiekamu uzskata ievadītās testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējo atgūstamību apmēram > 90 %.

Absorbcija

32. Absorbcijas sākotnējās aplēses var noteikt, no masas bilances aprēķina izslēdzot devas procentuālo daļu kuņģa un zarnu traktā un/vai ekskrementos. Par procentuālās absorbcijas aprēķināšanu sk. 33. punktu. Par ekskrēta izmeklēšanu sk. 44.–49. punktu. Ja absorbcijas apmēru pēc orālas ievadīšanas nevar precīzi noteikt, izmantojot masas bilances pētījumus (piemēram, ja ekskrementos ir vairāk nekā 20 % no ievadītās devas), var būt vajadzīgi turpmāki pētījumi. Šie pētījumi varētu ietvert vai nu 1) testējamās ķīmiskās vielas orālu ievadīšanu un izmērīšanu žultī, vai 2) testējamās ķīmiskās vielas orālu un intravenozu ievadīšanu un tās klātbūtnes izmērīšanu urīnā, un, abu ievadīšanas ceļu gadījumā, izelpotajā gaisā un līķī. Gan vienā, gan otrā pētījuma plānā kā testējamās ķīmiskās vielas un tās metabolītu konkrētās analīzes surogātmetodi paredz radioaktivitātes mērīšanu.

33. Ja izvēlas žults ekskrēcijas pētīšanu, parasti izmanto orālu ievadīšanu. Šajā pētījumā vismaz četru attiecīgā dzimuma (vai, ja nepieciešams, abu dzimumu) dzīvnieku žultsceļos ir jāievieto kanulas un jāievada testējamās ķīmiskās vielas vienreizēja deva. Pēc testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas jāmonitorē radioaktivitātes vai testējamās ķīmiskās vielas ekskrēcija, to darot žultī tik ilgi, cik vajadzīgs, lai varētu aplēst šādā ceļā izdalījušos ievadītās devas procentuālo daļu, pēc kuras iespējams tieši aprēķināt orālās absorbcijas apmēru, izmantojot šādu formulu:

$$\text{Procentuālā absorbcija} = \frac{(\text{daudzums žultī} + \text{urīnā} + \text{izelpotajā gaisā} + \text{līķī bez kuņģa un zarnu trakta satura})}{\text{ievadītais daudzums}} \times 100$$

34. Dažu testējamo ķīmisko vielu klašu gadījumā var notikt absorbētās devas tieša sekrēcija caur zarnu membrānām. Tādos gadījumos neuzskata, ka dati, ko pēc orālās devas ievadīšanas žurkai iegūst, ar žultsceļā ievadītas kanulas palīdzību izmērot šīs devas procentuālo daļu ekskrementos, atspoguļo neabsorbēto devas daļu. Gadījumos, kuros uzskata, ka ir notikusi sekrēcija zarnās, par absorbēto devas procentuālo daļu var spriest pēc absorbcijas, kas aprēķināta, ekskrēciju pēc orālas ievadīšanas salīdzinot ar ekskrēciju pēc intravenozas ievadīšanas (žurka bez kanulas vai žurka, kuras žultsceļā ievietota kanula) (sk. 35. punktu). Ja uzskata, ka jākvantificē sekrēcija zarnās, ir arī ieteicams pēc intravenozas devas ievadīšanas izmērīt ekskrēciju žurkai, kuras žultsceļā ievietota kanula.

▼M4

Biopieejamība

35. Biopieejamību var 50.–52. punktā aprakstītajā veidā noteikt pēc orālās un intravenozās grupas plazmas/asins kinētikas, izmantojot testējamās ķīmiskās vielas un/vai attiecīgā metabolīta vai metabolītu konkrētu ķīmisko analīzi, tāpēc radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela nav vajadzīga. Testējamās ķīmiskās vielas vai attiecīgā metabolīta vai metabolītu biopieejamību (F) var aprēķināt šādi:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Deva_{IV}/Deva_{exp}),$$

kur *AUC* ir apgabals zem līknes, kas raksturo sakarību starp koncentrāciju plazmā un laiku, bet *exp* ir eksperimentā izmantotais ievadīšanas ceļš (orāli, ārīga aplikācija vai inhalācija).

36. Sistēmiskas iedarbības riska novērtēšanā dzīvnieku pētījumos konstatētās sistēmiskās koncentrācijas salīdzinot ar analoģiskiem biomonitoringa datiem, kas iegūti pētījumos par darbinieku ekspozīciju, toksiskā komponenta biopieejamībai parasti tiek dota priekšroka salīdzinājumā ar procentuālo absorbciju. Situāciju var būt sarežģītāka, ja devas ir nelineārajā diapazonā, tāpēc toksikokinētiskā skrīningā ir svarīgi devas noteikt lineārajā diapazonā.

Vielas izplatīšanās audos

37. Informācija par testējamās ķīmiskās vielas un/vai tās metabolītu izplatīšanos audos ir svarīga, lai noteiktu mērķaudus un izprastu toksicitātes pamatā esošos mehānismus, kā arī lai iegūtu informāciju par testējamās ķīmiskās vielas un metabolīta akumulācijas un noturības potenciālu. Kopējās (radioaktīvās) devas procentuālā daļa audos, kā arī līķa pārējā daļā ir jāmēra vismaz ekskrēcijas eksperimenta beigās (piemēram, atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām parasti līdz septiņu vai mazāk dienu laikā pēc devas došanas). Ja pētījuma beigās testējamā ķīmiskā viela audos netiek konstatēta (piemēram, jo īsā pussabrukšanas perioda dēļ tā ir, iespējams, tikusi izvadīta no organisma pirms pētījuma beigām), jāraugās, lai dati netiktu interpretēti kļūdaini. Šādās situācijās vielas izplatīšanās audos ir jānoteic laikā, kad testējamās ķīmiskās vielas (un/vai metabolītu) koncentrācija plazmā/asinīs vai ekskrēcija ar urīnu ir maksimāla (T_{max}) pēc vajadzības (sk. 38. punktu). Turklāt var būt vajadzīga audu ievākšana papildu laikos, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas un/vai tās metabolītu izplatīšanos audos, izvērtētu atkarību no laika (attiecīgā gadījumā), kā arī lai vieglāk būtu noteikt masas bilanci un/vai lai izpildītu kompetentās iestādes prasības. Jāievāc tādi audi kā aknas, taukaudi, kuņģa un zarnu trakta audi, nieres, liesa, asinis pilnā sastāvā, atlikušais līķis un mērķorgānu audi, kā arī jebkādi citi audi (piemēram, vairogdziedzera audi, eritrocīti, reproduktīvie orgāni, āda, acs (it sevišķi pigmentētiem dzīvniekiem), kas varētu būt svarīgi testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskajā izvērtēšanā. Lai iespējami labāk izmantotu dzīvniekus, kā arī tad, ja subhroniskās vai hroniskās toksicitātes pētījumos tiek konstatēta toksicitāte mērķorgānos, jāapsver, vai tajos pašos laikos neizdarīt vēl kādu audu analīzes. Ziņojumā arī jānorāda (radioaktīvo) atlieku koncentrācija un audu un plazmas (asins) attiecības.

38. Var būt arī nepieciešams vai kompetentas iestādes prasīts vielas izplatīšanos audos izvērtēt papildu laikos, piemēram, laikā, kad koncentrācija plazmā/asinīs ir maksimāla (piemēram, T_{max}), vai laikā, kad maksimumu sasniegusi ekskrēcija ar urīnu (šo laiku noteic attiecīgajos plazmas/asins kinētikas vai ekskrēcijas eksperimentos). Šī informācija var būt noderīga, lai izprastu toksicitāti un testējamās ķīmiskās vielas un tās metabolītu akumulācijas un noturības potenciālu. Paraugu izvēle jāpamato. Analīzes paraugi parasti jāņem no tiem pašiem audiem, kas minēti iepriekš (sk. 37. punktu).

▼M4

39. Pētījumos par vielas izplatīšanās audos radioaktivitāti var kvantificēt, izmantojot orgānu secēšanu, homogenizāciju, sadedzināšanu un/vai šķīdināšanu, kurai seko uztverto atlikumu skaitīšana ar šķidruma scintilāciju (*LSC*) metodi. Nosakot testējamās ķīmiskās vielas izplatīšanos orgānos un/vai audos, noderīgi var būt daži jauni paņēmieni, kas pašlaik ir dažādās izstrādes stadijās, piemēram, kvantitatīvā visa ķermeņa autoradiogrāfija un receptoru mikroskopiskā autoradiogrāfija (3) (4).

40. Ja papildus orālai ekspozīcijai tiek izmantoti citi ekspozīcijas ceļi, ir jāievāc un jāanalizē specifiski audi, piemēram, plaušu audi inhalācijas pētījumos un ādas audi ārīgās aplikācijas pētījumos. Sk. 74.–78. punktu.

Metabolisms

41. Lai varētu noteikt un kvantificēt nepārveidotu testējamo ķīmisko vielu un tās metabolītus, ir jāievāc ekskrēts (un attiecīgā gadījumā plazma), kā aprakstīts 44.–49. punktā. Lai attiecīgajā devas grupā būtu vieglāk noteikt metabolītus, ir pieņemami ekskrētu apvienot. Ir ieteicams profilēt katra perioda metabolītus. Tomēr, ja parauga trūkuma un/vai radioaktivitātes dēļ tas nav iespējams, ir pieņemami apvienot dažādu laiku urīnu un ekskrementus, bet nav pieņemama apvienošana starp dažādiem dzimumiem vai devām. Ar attiecīgām kvalitatīvām un kvantitatīvām metodēm ir jāanalizē urīns, ekskrementi, radioaktīvais izelpotais gaiss no dzīvniekiem, kuri iepriekš saņēmuši devu, un attiecīgā gadījumā žults.

42. Pēc iespējas jācenšas noteikt visus metabolītus, kuru procentuālais īpatsvars no ievadītās devas ir 5 % vai lielāks, un ziņojumā jānorāda testējamās ķīmiskās vielas metabolisma shēma. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas, par kurām ir konstatēts, ka to daudzums ekskrētā ir 5 % un vairāk no ievadītās devas. Ar noteikšanu saprotama komponentu precīza strukturāla noskaidrošana. Parasti noteikšanu īsteno vai nu ar metabolīta paralēlu hromatogrāfiju ar zināmām standartvielām, izmantojot divas atšķirīgas sistēmas, vai ar paņēmieniem, ar kuriem ir iespējama pozitīva strukturāla noteikšana, piemēram, ar masspektrometriju, kodolmagnētisko rezonansi (*NMR*) utt. Paralēlas hromatogrāfijas gadījumā hromatogrāfijas paņēmienus, kuros izmanto vienu un to pašu stacionāro fāzi ar divām atšķirīgām šķīdinātāju sistēmām, neuzskata par pietiekamu metabolīta identitātes verificēšanu ar divām metodēm, jo šīs metodes nav neatkarīgas. Noteikšana ar paralēlu hromatogrāfiju ir jāīsteno, izmantojot divas atšķirīgas, analītiski neatkarīgas sistēmas, piemēram, reversās un normālās fāzes plānslāņa hromatogrāfiju (*TLC*) un augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfiju (*HPLC*). Ja hromatogrāfiskā nošķiršana ir pietiekami kvalitatīva, papildu apstiprināšana ar spektroskopiju nav vajadzīga. Viennozīmīga noteikšana ir arī iespējama, izmantojot metodes, kas sniedz strukturālu informāciju, piemēram: šķidrumhromatogrāfija/masspektrometrija (*LC-MS*) vai šķidrumhromatogrāfija/tandēmveida masspektrometrija (*LC-MS/MS*), gāzhromatogrāfija/masspektrometrija (*GC-MS*) un *NMR* spektrometrija.

43. Ja nav iespējama tādu metabolītu noteikšana, kuru procentuālais īpatsvars no ievadītās devas ir 5 % vai lielāks, galaziņojumā tas jāpamato/jāpaskaidro. Lai testējamās ķīmiskās vielas apdraudējuma un/vai riska novērtēšanā varētu labāk izprast metabolisko ceļu, var būt lietderīgi noteikt arī metabolītus, kuru ir mazāk nekā 5 % no ievadītās devas. Kad vien iespējams, jānodrošina strukturāls apstiprinājums. Tas var ietvert profilēšanu plazmā, asinīs vai citos audos.

▼M4

Ekskrēcija

44. Ievadītās devas ekskrēcijas ātrums un apmērs ir jānosaka, mērot no urīna, ekskrementiem un izelpotā gaisa atgūtās (radioaktīvās) devas procentuālo īpatsvaru. Šie dati arī palīdzēs noteikt masas bilanci. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) daudzumi, kas ir izvadīti no organisma ar urīnu, ekskrementiem un izelpoto gaisu, ir jānosaka ar piemērotiem laika intervāliem (sk. 47.–49. punktu). Atkārtotas devas eksperimenti ir pienācīgi jāplāno, lai būtu iespējams ievākt ekskrēcijas datus, kas vajadzīgi, lai sasniegtu 26. punktā aprakstītos mērķus. Tad šos eksperimentus būs iespējams salīdzināt ar vienreizējas devas eksperimentiem.

45. Ja ievadpētījumā ir konstatēts, ka ar izelpoto gaisu netiek izvadīts būtisks daudzums testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) (saskaņā ar 49. punktu), galīgajā pētījumā ievākt izelpoto gaisu nav nepieciešams.

46. Katrs dzīvnieks ir jāievieto atsevišķā metabolisma kamerā, lai varētu ievākt ekskrētu (urīnu, ekskrementus un izelpoto gaisu). Katra ievākšanas perioda beigās (sk. 47.–49. punktu), lai nodrošinātu iespējami labāku testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) atgūstamību, metabolisma kameras ir jāizskalo ar piemērotu šķīdinātāju (šis ir tā sauktais "būru mazgājamais ūdens"). Ekskrēta ievākšana jābeidz septiņu dienu laikā vai pēc tam, kad ir atgūti vismaz 90 % no ievadītās devas (atkarībā no tā, kas notiek ātrāk).

47. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējie daudzumi urīnā ievākšanas pirmajā dienā jānosaka vismaz divas reizes, no kurām vienai jābūt 24. stundā pēc devas ievadīšanas, savukārt pēc tam līdz pētījuma beigām noteikšana jāveic reizi dienā. Pirmajā dienā ir ieteicams izvēlēties vairāk nekā divus paraugu ņemšanas laikus (piemēram, 6., 12. un 24. stundā). Ievadpētījumu rezultāti ir jāanalizē, lai iegūtu informāciju par citādiem vai papildu ievākšanas laikiem. Ievākšanas grafiki ir jāpamato.

48. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējie daudzumi ekskrementos ir jānosaka reizi dienā, sākot ar 24. stundu pēc devas ievadīšanas, līdz pētījuma beigām, ja vien ievadpētījumi neliek ievadīšanas laikus mainīt vai papildināt. Citādi ievākšanas grafiki ir jāpamato.

49. Izelpotā CO_2 un citu gaistošo materiālu ievākšanu attiecīgā pētījuma eksperimentā var izbeigt, ja, 24 stundas ievācot izelpoto gaisu, tajā netiek konstatēts vairāk par 1 % no ievadītās devas.

Gaitas pētījumi

Plazmas/asins kinētika

50. Šo pētījumu mērķis ir aplēst testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētikas pamatparametrus (piemēram, C_{max}, T_{max}, pussabrukšanas periods ($t_{1/2}$), *AUCI*). Šos pētījumus var veikt ar vienu devu vai, drīzāk, ar divām vai vairāk devām. Devas ir jāizvēlas atkarībā no eksperimenta rakstura un/vai pētītās problēmas. Kinētikas dati var būt vajadzīgi, lai noskaidrotu tādus jautājumus kā testējamās ķīmiskās vielas biopieejamība un/vai lai noskaidrotu devas ietekmi uz klīrensu (piemēram, lai noskaidrotu, vai klīrensa piesātinājums ir atkarīgs no devas).

51. Šiem pētījumiem jāizmanto vismaz četri viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā. Izmantoto dzīvnieku dzimums jāpamato. Ja ir liecības, ka pastāv būtiskas, ar dzimumu saistītas toksicitātes atšķirības, jāapsver, vai neizmantot abus dzimumus (četrus tēviņus un četras mātītes).

▼M4

52. Pēc testējamās (radioaktīvi iezīmētās) ķīmiskās vielas ievadīšanas no katra dzīvnieka piemērotos laikos jāņem asins paraugi, izmantojot attiecīgu paraugu ņemšanas metodiku. No katra dzīvnieka ņemamo asins paraugu tilpumu un skaitu var ierobežot atkārtotas paraugu ņemšanas iespējamā ietekme uz dzīvnieka veselību/fizioloģiju un/vai analītiskās metodes jutīgumu. Ir jāanalizē katra atsevišķa dzīvnieka paraugi. Dažos gadījumos (piemēram, metabolītu raksturošana) var būt nepieciešams apvienot paraugus no vairākiem dzīvniekiem. Apvienotie paraugi ir nepārprotami jāidentificē, un apvienošana ir jāpaskaidro. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu testējamo ķīmisko vielu, var pietikt ar to, ka analizē kopējo radioaktivitāti. Tādā gadījumā kopējā radioaktivitāte ir jāanalizē pilnā asins ainā un plazmā vai plazmā un sarkanajos asinsķermenīšos, lai būtu iespējams aprēķināt attiecību starp saturu asinīs un plazmā. Citos gadījumos var būt vajadzīgi specifiskāki izmeklējumi, kuros ir jānosaka pamatsavienojums un/vai metabolīti vai jānovērtē saistīšanās ar olbaltumvielām.

Citu audu kinētika

53. Šo pētījumu mērķis ir iegūt informāciju par gaitu, lai noskaidrotu ar toksiskās iedarbības veidu, bioakumulāciju, bionoturību un tamlīdzīgiem aspektiem saistītus jautājumus, nosakot testējamās ķīmiskās vielas līmeņus dažādos audos. Audu izvēle un izvērtēto laika momentu skaits būs atkarīgi no noskaidrojamā jautājuma un testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskās datubāzes. Šos papildu pētījumus par audu kinētiku plānojot, ir jāņem vērā informācija, kas ievākta saskaņā ar 37.–40. punktu. Šajos pētījumos var izmantot vienreizēju vai atkārtotu devu. Izmantotā pieeja ir detalizēti jāpamato.

54. No citu audu kinētikas pētījumu iemesliem minami šādi:

— liecības par ilgāku pussabrukšanas periodu asinīs norāda uz iespējamu testējamās ķīmiskās vielas akumulēšanos dažādos audos,

— ir vēlme uzzināt, vai noteiktos audos ir sasniegts stacionārs līmenis (piemēram, ja atkārtotas devas pētījumos acīmredzami ir sasniegts stacionārs testējamās ķīmiskās vielas līmenis asinīs, taču ir vēlme pārliecināties, ka stacionārs līmenis ir sasniegts arī mērķaudos).

55. Šādu gaitas pētījumu ietvaros testējamās ķīmiskās vielas attiecīga orāla deva ir jāievada vismaz 4 dzīvniekiem uz katru devu katrā laikā un ir jāmonitorē vielas izplatīšanās gaita izraudzītajos audos. Ja nav novērota dzimumatkarīga toksicitāte, var izmantot tikai vienu dzimumu. Tas, vai tiks analizēta kopējā radioaktivitāte vai ķīmiskā pamatviela un/vai metabolīti, būs atkarīgs arī no noskaidrojamā jautājuma. Vielas izplatīšanās audos jānovērtē ar attiecīgiem paņēmieniem.

Enzīmu indukcija/inhibīcija

56. Pētījumi par pētījuma laikā notiekošās enzīmu indukcijas/inhibīcijas vai testējamās ķīmiskās vielas biotransformācijas sekām var būt vajadzīgi kādā vai vairākos no šādiem gadījumiem:

1) pieejamās liecības norāda uz sakarību starp testējamās ķīmiskās vielas biotransformāciju un pastiprinātu toksicitāti;

2) pieejamie toksicitātes dati norāda uz nelineāru sakarību starp devu un metabolismu;

▼M4

3) metabolītu noteikšanas pētījumu rezultāti liecina, ka ir konstatēts iespējami toksisks metabolīts, kas varējis rasties testējamās ķīmiskās vielas inducētā enzimātiskā ceļā;

4) lai izskaidrotu ietekmi, ko saista ar enzīmu indukcijas fenomenu;

5) ja ar vai nu *in vitro*, vai *in vivo* eksperimentiem ar dažādām sugām vai dažādos apstākļos tiek novērotas toksikoloģiski būtiskas pārmaiņas testējamās ķīmiskās vielas metaboliskajā profilā, var būt nepieciešams raksturot iesaistīto enzīmu vai enzīmus (piemēram, tādus I fāzes enzīmus kā no citohroma P450 atkarīgas monooksidāzes sistēmas izoenzīmi, tādus II fāzes enzīmus kā sulfotransferāzes izoenzīmi vai uridīna difosfāta glikuronoziltransferāzes izoenzīmi, vai citus attiecīgus enzīmus); šo informāciju var izmantot, lai izvērtētu sugas piemērotību ekstrapolēšanai uz citām sugām.

57. Lai izvērtētu ar testējamo ķīmisko vielu saistītas pārmaiņas toksikokinētikā, jāizmanto attiecīgi pētījuma protokoli, un šie protokoli ir pienācīgi jāvalidē un jāpamato. Pētījumu paraugplānos ir paredzēta neiezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotas devas ievadīšana, kam seko vienreizēja radioaktīvi iezīmēta deva 14. dienā, vai radioaktīvi iezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotas devas ievadīšana un paraugu ņemšana 1., 7. un 14. dienā metabolītu profilu noteikšanai. Radioaktīvi iezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotu devu ievadīšana var arī sniegt informāciju par bioakumulāciju (sk. 26. punktu).

PAPILDPIEEJAS

58. Lietderīgu informāciju par to, kā dažām sugām notiek testējamās ķīmiskās vielas absorbcija, izplatīšanās, metabolisms vai izvadīšana no organisma, var sniegt papildpieejas, kas iziet ārpus šajā testēšanas metodē aprakstītajiem *in vivo* eksperimentiem.

***In vitro* informācijas izmantošana**

59. Vairākus jautājumus, kas attiecas uz testējamās ķīmiskās vielas metabolismu, var noskaidrot *in vitro* pētījumos, kuros izmanto piemērotas testēšanas sistēmas. Lai pētītu iespējamos metabolītus, var izmantot tikko izolētus vai kultivētus hepatocītus un subcelulārās frakcijas (piemēram, mikrosomas un citosolu jeb frakciju S9) no aknām. Riska novērtēšanai var būt lietderīgi noteikt vietējo metabolismu mērķorgānā, piemēram, plaušās. Šim nolūkam var izmantot mērķaudu mikrosomālās frakcijas. Pētījumos ar mikrosomām var noteikt iespējamas atšķirības starp dzimumiem un mūža posmiem, kā arī raksturot enzīmu parametrus (K_m un V_{max}), kas var palīdzēt novērtēt metabolisma atkarību no devas kopsakarā ar ekspozīcijas līmeņiem. Turklāt mikrosomas var palīdzēt noteikt, kādi konkrēti mikrosomālie enzīmi ir iesaistīti testējamās ķīmiskās vielas metabolismā, un tas var noderēt ekstrapolēšanai uz citām sugām (sk. arī 56. punktu). Biotransformācijas inducēšanās potenciālu var arī noteikt *in vitro* pētījumos ar hepatocītu inducēšanos vai ar konkrētām šūnu līnijām, kurām notiek attiecīgo enzīmu ekspresija, izmantojot tādu dzīvnieku aknu subcelulārās frakcijas (piemēram, mikrosomas un citosolu), kuriem iepriekš ievadīta interesējošā testējamā ķīmiskā viela. Lai noteiktu, kā biotransformācija dažādām sugām var atšķirties, atsevišķos gadījumos un attiecīgos apstākļos var apsvērt cilvēka audu subcelulāro frakciju izmantošanu. *In vitro* pētījumu rezultātus var arī izmantot *PBTK* modeļu veidošanā (5).

▼M4

60. Pētījumi par *in vitro* absorbciju ādā var sniegt papildu informāciju absorbcijas raksturošanai (6).

61. Lai noskaidrotu tādus pašus jautājumus kā attiecībā uz aknu mikrosomām, var izmantot primāro šūnu kultūras no aknu šūnām un svaigu audu segmentus. Dažos gadījumos atbildes uz konkrētiem jautājumiem var rast, izmantojot šūnu līnijas, kurām ir izteikta attiecīgā enzīma ekspresija, vai ar inženieriju iegūtas šūnu līnijas. Dažos gadījumos var būt lietderīgi *in vitro* pētīt konkrētu citohroma P450 izozīmu (piemēram, CYP1A1, 2E1, 1A2 un citu) un/vai II fāzes enzīmu indukciju un inhibīciju, ko izraisa pamatsavienojums. Iegūto informāciju var izmantot strukturāli līdzīgiem savienojumiem.

Toksicitātes pētījumos iegūto toksikokinētikas datu izmantošana par papildinformāciju

62. Jebkādos citos toksicitātes pētījumos iegūto asins, audu un/vai ekskrēta paraugu analīze var sniegt datus par biopieejamību, to, kā koncentrācija plazmā mainās atkarībā no laika (*AUC*, C_{max}), bioakumulācijas potenciālu, klīrensa ātrumu un metabolisma un kinētikas pārmaiņām atkarībā no dzimuma vai mūža posma.

63. Pētījuma plānu var izmantot, lai rastu atbildes uz tādiem jautājumiem kā absorbcijas piesātinājums, biotransformācijas vai ekskrēcijas ceļi augstāku devu līmeņu gadījumā, jaunu metabolisma ceļu darbība augstāku devu gadījumā un toksisko metabolītu ierobežojumi augstāko devu gadījumā.

64. No citiem apdraudējuma novērtēšanas aspektiem minami šādi:

— ar vecumu saistīta jutība, ko rada asins–smadzeņu barjeras stāvokļa, kā arī nieru atšķirības un/vai detoksicētspējas atšķirības,

— subpopulācijas jutība, ko rada atšķirīga biotransformētspēja vai citas toksikokinētiskas atšķirības,

— augļa vai jaundzimušā ekspozīcijas apmērs, ja ķīmiskās vielas attiecīgi iziet caur placentu vai nonāk pienā.

Toksikokinētiskās modelēšanas izmantošana

65. Toksikokinētiskos modeļus var izmantot dažādiem apdraudējuma un riska novērtējuma aspektiem, piemēram, prognozējot sistēmisku ekspozīciju un devu, ko saņem iekšējie audi. Turklāt var aplūkot konkrētus jautājumus par iedarbības veidu, un šie modeļi var nodrošināt pamatu ekstrapolēšanai uz dažādām sugām, ekspozīcijas ceļiem un dozējuma modeļiem, kā arī cilvēka riska novērtēšanai. Dati, ko var izmantot testējamās ķīmiskās vielas *PBTK* modeļu izstrādei jebkurai attiecīgajai sugai, ietver 1) sadalījuma koeficientus; 2) bioķīmiskās konstantes un fizioloģiskos parametrus; 3) konkrēta ievadīšanas ceļa absorbcijas parametrus; un 4) *in vivo* kinētiskos datus modeļu izvērtēšanai (piemēram, klīrensa parametri attiecībā uz attiecīgajiem (> 10 %) ekskrēcijas ceļiem, K_m un V_{max} attiecībā uz metabolismu). Modeļu izstrādē izmantotie eksperimentu dati ir jāiegūst ar zinātniski pamatotām metodēm, savukārt modeļu rezultāti ir jāvalidē. Lai būtu vieglāk izstrādāt beznodalījuma modeļus vai modeļus, kuru pamatā ir fizioloģija, nereti nosaka testējamai ķīmiskajai vielai un sugai raksturīgos parametrus, piemēram, absorbcijas ātrumu, sadalīšanos starp asinīm un audiem, kā arī metabolisma ātruma konstantes (7).

▼M4

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

66. Pētījuma ziņojumā ir ieteicams dot satura rādītāju.

Ziņojuma pamatdaļa

67. Ziņojuma pamatdaļā ir jāsniedz šīs testēšanas metodes aptvertā informācija, kas sakārtota šādās sadaļās un punktos.

Kopsavilkums

68. Šajā pētījuma ziņojuma sadaļā jāsniedz pētījuma plāna kopsavilkums un izmantoto metožu apraksts. Tajā jāuzsver arī svarīgākie konstatējumi attiecībā uz masas bilanci, metabolītu raksturu un daudzumu, atliekām audos, klīrensa ātrumu, bioakumulācijas potenciālu, ar dzimumu saistītām atšķirībām utt. Kopsavilkumam jābūt pietiekami detalizētam, lai šos konstatējumus būtu iespējams izvērtēt.

Ievads

69. Šajā ziņojuma sadaļā jāapraksta pētījuma mērķi, pamatojums un plāns, kā arī jāsniedz attiecīgas atsauces un jebkāda priekšvēsture.

Materiāli un metodes

70. Šajā ziņojuma sadaļā detalizēti jāsniedz visa attiecīgā informācija, tostarp:

a) testējamā ķīmiskā viela

Šajā apakšsadaļā jāidentificē testējamā ķīmiskā viela, aptverot tās ķīmisko nosaukumu, molekulāro struktūru, tās ķīmisko sastāvu kvalitatīvā un kvantitatīvā aspektā, ķīmisko tīrību un, ja iespējams, jebkādu piemaisījumu veidu un daudzumus. Jāietver arī informācija par fizikālajām/ķīmiskajām īpašībām, arī par agregātstāvokli, krāsu, izteiktu šķīdību un/vai sadalījuma koeficientu, stabilitāti un attiecīgā gadījumā kodīgumu. Attiecīgā gadījumā jāsniedz informācija par izomēriem. Ja testējamā ķīmiskā viela ir radioaktīvi iezīmēta, šajā apakšsadaļā jāietver informācija par radionuklīda veidu, iezīmēto vietu, konkrēto iedarbību un radioķīmisko tīrību.

Jānorāda, kāda veida nesējvielas, atšķaidītāji, suspendējoši preparāti un emulgatori vai citi materiāli izmantoti testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanā, vai tie jāapraksta.

b) testa dzīvnieki

Šajā apakšsadaļā jāsniedz informācija par testa dzīvniekiem, arī par sugu, līnijas un vecuma izvēli un pamatojumu pētījuma sākumā, kā arī par dzimumu, ķermeņa svaru, veselības stāvokli un dzīvnieku turēšanu.

c) metodes

Šajā apakšsadaļā jāietver sīka informācija par pētījuma plānu un izmantoto metodiku. Jāapraksta:

1) attiecīgā gadījumā jebkādas ekspozīcijas ceļa un apstākļu maiņas pamatojums;

▼M4

2) izraudzīto devu līmeņu pamatojums;

3) ja vajadzīgs, ievadpētījumi, kas izmantoti turpmāko pētījumu eksperimentu plānošanai; jāsniedz ievadpētījumu pamatojošie dati;

4) kā tika sagatavots devu šķīdums un kāds šķīdinātājs vai nesējviela tika izmantoti (ja tie izmantoti);

5) apstrādes grupu skaits un dzīvnieku skaits grupās;

6) devu līmeņi un tilpums (un devas konkrētā iedarbība, ja tika izmantota radioaktivitāte);

7) ievadīšanas ceļš vai ceļi un metodes;

8) devu ievadīšanas biežums;

9) nebarošanas periods (ja tas izmantots);

10) kopējā radioaktivitāte katram dzīvniekam;

11) rīkošanās ar dzīvniekiem;

12) paraugu ņemšana un apstrāde;

13) analītiskās metodes, kas izmantotas metabolītu atdalīšanai, kvantificēšanai un identificēšanai;

14) ar izmantotajām metodēm saistītā noteikšanas robeža;

15) citi eksperimentu mērījumi un izmantotās procedūras (arī metabolītu analīzes metožu validēšana).

d) statistiskā analīze

Ja pētījuma konstatējumu analizēšanai tika izmantota statistiskā analīze, jāsniedz pietiekami plaša informācija par izmantoto analīzes metodi un datorprogrammu, lai neatkarīgs recenzents/statistiķis analīzi varētu atkārtoti izvērtēt un rekonstruēt.

Sistēmu modelēšanas pētījumu, piemēram, *PBTK*, gadījumā modeļu raksturojumā jāietver tāds pilnīgs modeļa apraksts, pēc kura to iespējams neatkarīgi rekonstruēt un validēt (sk. 65. punktu un papildinājumu "Definīcijas").

Rezultāti

71. Visi dati jāapkopo tabulā ar attiecīgu statistisko izvērtējumu, kā arī jāapraksta šajā sadaļā. Radioaktivitātes skaitīšanas dati ir jāapkopo un jāizklāsta atbilstoši pētījuma vajadzībām, parasti mikrogramos vai miligrama ekvivalentos uz parauga svaru, lai gan var izmantot arī citas vienības. Šajā sadaļā ir jāietver konstatējumu grafiski attēlojumi, reprezentatīvu hromatogrāfisko un spektrometrisko datu atveids, dati par metabolītu identificēšanu/kvantificēšanu un hipotētiskajiem metabolisma ceļiem, arī par metabolītu molekulāro struktūru. Papildus attiecīgā gadījumā šajā sadaļā jāietver šāda informācija:

1. Radioaktivitātes kvantitatīvā un procentuālā atgūstamība ar urīnu, ekskrementiem, izelpoto gaisu un būra mazgājamo ūdeni, kas satur urīnu un ekskrementus.

— Ārīgas aplikācijas pētījumos jāsniedz arī dati par testējamās ķīmiskās vielas atgūstamību ar apstrādātu ādu, ādas nomazgājumiem un par atlikušo radioaktivitāti ādas apstrādāšanas ierīcē un metabolisma kamerā, kā arī ādas mazgāšanas pētījuma rezultāti. Jautājums tālāk aplūkots 74.–77. punktā.

▼M4

— Inhalācijas pētījumos jāsniedz arī dati par testējamās ķīmiskās vielas atgūstamību no plaušām un deguna audiem (8). Jautājums tālāk aplūkots 78. punktā.

2. Vielas izplatīšanās audos, kuru raksturo ar ievadītās devas un koncentrācijas procentuālo īpatsvaru (mikrogramos uz 1 gramu audu), kā arī ar attiecību starp saturu audos un asinīs vai audos un plazmā.

3. Materiālu bilance, kas iegūta katrā pētījumā, kurā analizē ķermeņa audus un ekskrētu.

4. Koncentrācija plazmā un toksikokinētiskie parametri (biopieejamība, *AUC*, C_{max}, T_{max}, klīrenss, pussabrukšanas periods) pēc ievadīšanas pa attiecīgo ekspozīcijas ceļu vai ceļiem.

5. Testējamās ķīmiskās vielas absorbcijas ātrums un apmērs pēc ievadīšanas pa attiecīgo ekspozīcijas ceļu vai ceļiem.

6. Ekskrētā ievākto testējamās ķīmiskās vielas un metabolītu daudzumi (kā procentuālais īpatsvars no ievadītās devas).

7. Atsauces uz papildinājuma datiem, tostarp atsevišķu dzīvnieku datiem par visiem mērīšanas beigupunktiem (piemēram, devu ievadīšanu, procentuālo atgūstamību, koncentrācijām.

8. Attēls ar hipotētiskajiem metabolisma ceļiem un metabolītu molekulāro struktūru.

Iztirzājums un secinājumi

72. Šajā sadaļā autoriem:

1) jānorāda hipotētiskais metabolisma ceļš, pamatojoties uz testējamās ķīmiskās vielas metabolisma un izdalīšanās rezultātiem;

2) jāapspriež visas iespējamās sugu un dzimumu atšķirības attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas izdalīšanos un/vai biotransformāciju;

3) jāizveido tabulas un jāapspriež metabolītu noteikšana un daudzums, klīrensa ātrums, bioakumulācijas potenciāls, kā arī pamatvielas un/vai metabolīta(-u) atlieku līmenis audos un attiecīgā gadījumā iespējamās no devas atkarīgās toksikokinētisko parametru maiņas;

4) jāiestrādā visi būtiskie toksikokinētikas dati, kas iegūti toksicitātes pētījumu gaitā;

5) jāsniedz īsi secinājumi, ko var pamatot ar pētījuma konstatējumiem;

6) attiecīgā gadījumā jāpievieno jaunas sadaļas.

73. Papildu sadaļas jāizmanto, lai sniegtu pamatojošu bibliogrāfisku informāciju, tabulas, attēlus, pielikumus utt.

▼M4

ALTERNATĪVI EKSPOZĪCIJAS CEĻI

Ārīga aplikācija

Ādas apstrādāšana

74. Šajā sadaļā ir sniegta konkrēta informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētikas pētīšanu ar ārīgu aplikāciju. Attiecībā uz absorbciju ādā ir jāizmanto šā pielikuma B.44. nodaļa "Absorbcija ādā: *in vivo* metode" (9). Attiecībā uz citiem beigupunktiem, piemēram, izplatīšanos un metabolismu, jāizmanto šī B.36. testēšanas metode. Ādas apstrādāšanā ir jāizmanto viens vai vairāki testējamās ķīmiskās vielas devu līmeņi. Testējamai ķīmiskajai vielai (piemēram, tīram, atšķaidītam vai salikta sastāva materiālam, kas satur testējamo ķīmisko vielu, kura tiek aplicēta uz ādas) jābūt tai pašai (vai reālistiskam surogātam), kuras iedarbībai var tikt pakļauts cilvēks vai, iespējams, citas mērķsugas. Devu līmenis(-ņi) ir jāizvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 20.–26. punktu. No faktoriem, kurus varētu ņemt vērā ārīgās aplikācijas devu izvēlē, minama gaidāmā cilvēka ekspozīcija un/vai devas, kuru gadījumā toksicitāte tikusi novērota citos ārīgās aplikācijas toksicitātes pētījumos. Ārīgās aplikācijas deva(-as), ja vajadzīgs, ir jāizšķīdina piemērotā nesējvielā un jāaplicē tādā tilpumā, ar kuru pietiek, lai deva tiktu saņemta. Neilgi pirms testēšanas ir jānocērp apmatojums uz testa dzīvnieku muguras. Ādu var arī noskūt, bet tas jādara aptuveni 24 stundas pirms testa. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu, jo tas varētu mainīt ādas caurlaidību. Lai aplicētu testējamo ķīmisko vielu, no apmatojuma jāatbrīvo aptuveni 10 % ķermeņa virsmas. Ja ķīmiskās vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamā ādas virsma var būt mazāka par 10 %, bet iespējami lielāka daļa šīs virsmas ir jānoklāj plānā un vienmērīgā kārtā. Visām ārīgās aplikācijas testa grupām jāizmanto vienāda lieluma apstrādes virsmas. Ar devu apstrādātās virsmas ir jāaizsargā ar piemērotu pārklāju, kas nostiprināts. Dzīvnieki ir jātur atsevišķi cits no cita.

75. Lai novērtētu, cik daudz testējamās ķīmiskās vielas aplicētās devas ar maigām ziepēm un ūdeni var nomazgāt no apstrādātās ādas zonas, jāizdara ādas mazgāšanas pētījums. Šis pētījums var arī palīdzēt testējamās ķīmiskās vielas ārīgā aplicēšanā noteikt masas bilanci. Šajā ādas mazgāšanas pētījumā diviem dzīvniekiem aplicē vienreizēju testējamās ķīmiskās vielas devu. Devas līmeni izvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 23. punktu (attiecībā uz dermālā kontakta ilgumu sk. 76. punktu). Ir jānosaka ar mazgāšanu atgūtie testējamās ķīmiskās vielas daudzumi, lai novērtētu testējamās ķīmiskās vielas nomazgāšanas rezultativitāti.

76. Ja vien to neliedz kodīgums, testējamā ķīmiskā viela ir jāaplicē un uz ādas jātur vismaz sešas stundas. Pārklāju noņemot, apstrādātā zona ir jānomazgā saskaņā ar procedūru, kas norādīta ādas mazgāšanas pētījumam (sk. 75. punktu). Gan pārklājs, gan mazgāšanas ūdens ir jāanalizē, nosakot, cik tajos palicis testējamās ķīmiskās vielas. Pēc pētījumu pabeigšanas visi dzīvnieki ir humāni jānonāvē saskaņā ar (2) un apstrādātā āda ir jānoņem. Piemērots apstrādātās ādas fragments jāanalizē, lai noteiktu, cik testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) palicis ādā.

77. Farmaceitisko preparātu toksikokinētikas novērtēšanā var būt vajadzīgas citādas procedūras, kas atkarīgas no regulatīvās sistēmas.

▼M4

Inhalācija

78. Jāizmanto viena testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija (vai vairākas, ja vajadzīgs). Koncentrācija(-as) ir jāizvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 20.–26. punktu. Inhalatīvā apstrāde jāveic, izmantojot tikai deguna vai tikai galvas ekspozīcijas aparātus, lai novērstu absorbēšanos pa citiem ekspozīcijas ceļiem (8). Ja tiek izmantoti citādi inhalācijas ekspozīcijas apstākļi, ziņojumā šī atkāpe jāpamato. Jāparedz noteikts inhalācijas ekspozīcijas ilgums; parasti tas ir 4–6 stundas.

LITERATŪRA

(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 N°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) Šā pielikuma B.45. nodaļa "Absorbcija ādā: *in vitro* metode".

(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) Šā pielikuma B.44. nodaļa "Absorbcija ādā: *in vivo* metode".

(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

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Absorbcija*:* process vai procesi, kuros audi uzņem ķīmiskās vielas vai tās nodod tālāk citiem audiem. Par absorbciju runā attiecībā uz pamatsavienojumu un visiem tā metabolītiem. Nejaukt ar "biopieejamību".

Akumulācija (bioakumulācija): testējamās ķīmiskās vielas daudzuma palielināšanās laika gaitā audos (parasti taukaudos pēc atkārtotas ekspozīcijas). Ja testējamā ķīmiskā viela organismā nonāk straujāk, nekā no tā tiek izvadīta, organisms testējamo ķīmisko vielu akumulē un var iestāties testējamās ķīmiskās vielas toksiska koncentrācija.

ADME*:* akronīms, kas nozīmē "absorbcija, izplatīšanās, metabolisms un ekskrēcija".

AUC*:* (apgabals zem līknes, kas raksturo, kā koncentrācija plazmā ir atkarīga no laika): apgabals zem līknes grafiski attēlo testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju plazmā kā laika funkciju. Tas atspoguļo ķermeņa kopējo absorbēto testējamās ķīmiskās vielas daudzumu iepriekš noteiktā laika periodā. Lineāros apstākļos *AUC* (laikā no nulles līdz bezgalībai) ir proporcionāls kopējam testējamās ķīmiskās vielas daudzumam, ko organisms absorbējis neatkarīgi no absorbcijas ātruma.

Autoradiogrāfija (visa ķermeņa autoradiogrāfija)*:* paņēmiens, ar ko kvalitatīvi un/vai kvantitatīvi noteic radioaktīvas testējamās ķīmiskās vielas lokalizāciju audos, šajā nolūkā reģistrējot izmeklētajā objektā emitēto radiāciju, lai ar rentgenfilmas vai (pēdējā laikā) digitālās fosforattēlveides palīdzību vizualizētu radioaktīvi iezīmētas molekulas vai molekulu fragmentus. Visa ķermeņa kvantitatīvajai autoradiogrāfijai salīdzinājumā ar orgānu secēšanu var būt dažas priekšrocības, izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas izplatīšanos un novērtējot radioaktīvā materiāla kopējo atgūstamību un izšķiramību audos. Piemēram, viena būtiska priekšrocība ir tāda, ka to var izmantot, lai pigmentētā dzīvniekmodelī novērtētu testējamās ķīmiskās vielas iespējamo saistību ar melanīnu, kas var piesaistīt noteiktas molekulas. Tomēr ar šo paņēmienu var gan iegūt ērtus visa ķermeņa kopskatus attiecībā uz augstas kapacitātes un zemas afinitātes saistvietām, taču tikai ierobežoti atpazīt receptoru saistvietas un tamlīdzīgas konkrētas mērķvietas, kuru konstatēšanai ir vajadzīga samērā augsta izšķirtspēja un augsts jutīgums. Ja tiek izmantota autoradiogrāfija, eksperimenti, kuros nosaka ievadītā savienojuma masas bilanci, jāveic ar atsevišķu grupu vai atsevišķi no eksperimenta, kurā pēta vielas izplatīšanos audos, homogenizējot un ar šķidruma scintilāciju skaitīšanu analizējot visu ekskrētu (kas var ietvert arī izelpoto gaisu) un visus līķus.

Žults ekskrēcija*:* ekskrēcija pa žultsceļiem.

Bioakumulācija*:* sk. "Akumulācija".

Biopieejamība*:* ievadītās devas daļa, kas nonāk lielajā asinsrites lokā vai kļūst pieejama fizioloģiskās aktivitātes vietā. Parasti par testējamās ķīmiskās vielas biopieejamību runā attiecībā uz pamatsavienojumu, taču šo jēdzienu var attiecināt arī uz tās metabolītu. Tas attiecas tikai uz vienu ķīmisko formu. *Nota bene:* biopieejamība un absorbcija nav viens un tas pats. Atšķirību, piemēram, starp orālu absorbciju (t. i., klātbūtni zarnu sienā un vārtu vēnas sistēmas asinsritē) un biopieejamību (t. i., klātbūtni lielajā asinsrites lokā un audos) cita starpā var radīt ķīmiskā noārde zarnu sienu metabolisma dēļ, atpakaļizplūde uz zarnu lūmenu vai pirmssistēmas metabolisms aknās (10). Toksiskā komponenta (pamatsavienojuma vai metabolīta) biopieejamība ir ļoti svarīgs parametrs cilvēka riska novērtēšanā (ekstrapolēšanā no augstas devas uz zemu, no viena ceļa uz citu), jo dod iespēju no ārējā *NOAEL* vai *BMD* (ievadītās devas) atvedināt iekšējo vērtību. Lai orālas ievadīšanas gadījumā noskaidrotu iedarbību uz aknām, pietiek ar orālu absorbciju. Tomēr attiecībā uz jebkuru citu iedarbību, kas nav ievadīšanas vietā, parasti tieši biopieejamība, nevis absorbcija ir drošāks parametrs turpmākai izmantošanai riska novērtēšanā.

Bioloģiskā noturība*:* sk. "Noturība".

Biotransformācija*:* organismā notiekoša interesējošās testējamas ķīmiskās vielas ķīmiska (parasti enzimātiska) pārvēršanās par citu ķīmisko vielu. Sinonīms "metabolismam".

▼M4

C_{max}*:* maksimālā pēcievadīšanas koncentrācija asinīs (plazmā/serumā) vai maksimālā pēcievadīšanas ekskrēcija (urīnā vai ekskrementos).

Klīrensa ātrums*:* kvantitatīvi izteikts ātrums, kādā testējama ķīmiskā viela tiek izvadīta no asinīm, plazmas vai noteiktiem audiem (daudzums laika vienībā).

Nodalījums*:* ķermeņa, audu vai šūnas strukturāla vai bioķīmiska daļa (vai vienība), kas ir nodalīta no pārējās daļas.

Detoksikācijas ceļi*:* to cita citai sekojošu norišu virknes, kuru gaitā toksiskas ķīmiskas vielas ar metaboliskām pārmaiņām vai ekskrēciju izzūd no organisma.

Izplatīšanās*:* testējamās ķīmiskās vielas un tās atvasinājumu izkliedēšanās pa ķermeni.

Enzīmi/izozīmi*:* olbaltumvielas, kas katalizē ķīmiskas reakcijas. Izozīmi ir enzīmi, kas katalizē vienas un tās pašas ķīmiskas reakcijas, bet atšķiras pēc aminoskābju virknes to molekulā.

Enzimātiskie parametri*:* K_m – Mihaelisa (*Michaelis*) konstante; V_{max} – maksimālais ātrums.

Ekskrēcija*:* process vai procesi, kuros organismā ievadītā testējamā ķīmiskā viela un/vai tās metabolīti tiek no ķermeņa izvadīti.

Eksogēns*:* organismā vai sistēmā no ārienes ievadīts vai ārpus tiem ģenerēts.

Ekstrapolācija*:* vienas vai vairāku nezināmu vērtību izsecināšana no tā, kas ir zināms vai novērots.

Pussabrukšanas periods ($t_{1/2}$)*:* laiks, kas paiet, līdz testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija nodalījumā samazinās uz pusi. Parasti par to runā attiecībā uz koncentrāciju plazmā vai uz testējamās ķīmiskās vielas daudzumu visā ķermenī.

Indukcija / enzīmu indukcija*:* enzīmu sintezēšanās kā atbilde uz vides stimulu vai inducētājmolekulu.

Linearitāte / lineārā kinētika*:* process ir kinētiski lineārs, ja visi pārneses ātrumi starp nodalījumiem ir proporcionāli klātesošajiem daudzumiem vai koncentrācijām, t. i., pirmēji. Tādējādi klīrensa ātrums un izplatīšanās tilpums, tāpat kā pussabrukšanas periodi, ir nemainīgi. Sasniegtās koncentrācijas ir proporcionālas devas došanas intensitātei (ekspozīcijai), un ir vieglāk prognozēt akumulāciju. Linearitāti/nelinearitāti var novērtēt, attiecīgos parametrus, piemēram, *AUC*, salīdzinot pēc dažādām devām vai arī pēc vienreizējas un atkārtotas ekspozīcijas. Tas, ka nav atkarības no devām, var norādīt uz savienojuma metabolismā iesaistīto enzīmu piesātinājumu, savukārt tas, ka *AUC* pēc atkārtotas ekspozīcijas ir lielāks nekā pēc vienreizējas ekspozīcijas, var norādīt uz metabolisma inhibēšanu, bet tas, ka *AUC* pēc atkārtotas ekspozīcijas ir mazāks, var norādīt uz metabolisma inducēšanu (sk. arī (11)).

Masas bilance*:* tas, cik testējamās ķīmiskās vielas tiek ievadīts sistēmā un cik no tās izvadīts.

Materiālā bilance*:* sk. "Masas bilance".

Toksicitātes mehānisms (veids) / iedarbības mehānisms (veids)*:* par iedarbības mehānismu runā attiecībā uz konkrētu bioķīmisku mijiedarbību, ar kuras starpniecību testējamā ķīmiskā viela iedarbojas. Par iedarbības veidu runā attiecībā uz vispārīgākiem ceļiem, kuri noved pie testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes.

▼M4

Metabolisms*:* sinonīms “biotransformācijai”.

Metabolīti*:* metabolisma vai metabolisku procesu produkti.

Orāla absorbcija*:* testējamās ķīmiskās vielas devas procentuālā daļa, kas tiek absorbēta no ievadīšanas vietas (t. i., kuņģa un zarnu trakta). Šo svarīgo parametru var izmantot, lai noskaidrotu, kāda ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daļa nonāk vārtu vēnā un pēc tam aknās.

Sadalījuma koeficients*:* skaitliski izteikta ķīmiskās vielas diferenciālā šķīdība divos šķīdinātājos; saukts arī par sadalīšanās koeficientu.

Maksimālie līmeņi asinīs (plazmā/serumā)*:* maksimālā koncentrācija (maksimumkoncentrācija) asinīs (plazmā/serumā) pēc ievadīšanas (sk. arī “C_{max}”).

Noturība (bioloģiskā noturība)*:* ķīmiskas vielas ilgstoša klātbūtne (bioloģiskā sistēmā) sakarā ar izturību pret noārdīšanu/izvadīšanu no organisma.

Analoģijas princips*:* izmantojot informāciju par vienas vai vairāku ķīmisko vielu testēšanas beigupunktiem, prognozē ķīmiskās mērķvielas testēšanas beigupunktu.

Receptoru mikroskopiskā autoradiogrāfija *(jeb receptoru mikroautoradiogrāfija):* šo paņēmienu var izmantot, pētot ksenobiotisko mijiedarbību ar specifiskām vietām audos vai specifiskām šūnu populācijām, piemēram, veicot tādus pētījumos par receptoru saistvietām vai specifiskiem to darbības veidiem, kuros var būt vajadzīga augsta izšķirtspēja un augsts jutīgums, ko citi paņēmieni, piemēram, visa ķermeņa autoradiogrāfija, var nenodrošināt.

Ievadīšanas ceļš *(orāls, intravenozs, dermāls jeb ar ārīgu aplikāciju, inhalatīvs utt.):* attiecas uz to, kādā veidā ķīmiskās vielas ievada organismā (piemēram, orāli ar zondi; orāli ar uzturu; ar ārīgu aplikāciju; ar inhalāciju; intravenozi utt.)

Piesātinājums*:* stāvoklis, kurā viens vai vairāki kinētiskie procesi (piemēram, absorbcija, metabolisms vai klīrenss) ir maksimālā līmenī (proti, “piesātināti”).

Jutība*:* metodes vai instrumenta spēja atšķirt mērreakcijas, kas atspoguļo dažādus interesējošā mainīgā lieluma līmeņus.

Stacionārs līmenis asinīs (plazmā)*:* nelīdzsvarots atvērtas sistēmas stāvoklis, kurā visus spēkus, kas uz sistēmu iedarbojas, precīzi kompensē pretēji spēki, tā ka visu tās komponentu koncentrācija ir stacionāra, lai gan caur sistēmu plūst viela.

Sistēmu modelēšana *(toksikokinētiski fizioloģiska, farmakokinētiska, farmakokinētiski fizioloģiska, bioloģiska utt.):* abstrakti modeļi, kuros sistēmas izturēšanos apraksta matemātiskā valodā.

Mērķaudi*:* audi, kuros izpaužas toksiskas vielas svarīgākā nelabvēlīgā ietekme.

▼M4

Testējamā ķīmiskā viela*:* jebkāda ķīmiska viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Izplatīšanās audos*:* testējamas ķīmiskās vielas apgriezeniska pārvietošanās no vienas vietas organismā uz citu. Vielas izplatīšanos audos var pētīt ar orgānu secēšanu, homogenizāciju, sadedzināšanu un šķidruma scintilāciju skaitīšanu vai ar kvalitatīvu un/vai kvantitatīvu visa ķermeņa autoradiogrāfiju. Pirmie no minētajiem paņēmieniem var noderēt, lai koncentrācijas ziņā un procentuāli noskaidrotu atgūstamību no to pašu dzīvnieku audiem un līķa pārējās daļas, taču tiem var pietrūkt izšķirtspējas attiecībā uz visiem audiem un ar tiem nevar panākt ideāli pietiekamu kopējo atgūstamību (< 90 %). Attiecībā uz autoradiogrāfiju sk. definīciju iepriekš.

$\mathbf{T_{max}}$*:* laiks, kurā sasniedz C_{max}.

Toksikokinētika *(farmakokinētika):* pēta ķīmisko vielu absorbciju, izplatīšanos, metabolismu un ekskrēciju laika gaitā.

Modeļu validēšana*:* process, kurā novērtē, vai modelis ir pietiekams pieejamo toksikokinētikas datu konsekventai aprakstīšanai. Modeļus var izvērtēt, modeļu prognozes statistiski un vizuāli salīdzinot ar eksperimentālām vērtībām attiecībā pret kopīgu neatkarīgu mainīgo (piemēram, laiku). Izvērtēšanas pakāpe jāpamato attiecībā uz paredzēto modeļa izmantošanu.

▼B

B.37. **FOSFORORGANISKO VIELU AIZKAVĒTĀ NEIROTOKSICITĀTE PĒC AKŪTAS IEDARBĪBAS**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Novērtējot vielu toksisko ietekmi, ir svarīgi ņemt vērā, ka dažu klašu vielas spēj izraisīt īpaša veida neirotoksicitāti, ko nevar noteikt citos toksicitātes pētījumos. Ir novērots, ka dažas fosforganiskās vielas izraisa aizkavētu neirotoksicitāti, un tās ir jāuzskata par kandidātēm vērtēšanai.

Lai identificētu vielas, kas var izraisīt aizkavēto polineiropātiju, var izmantot *in vitro* skrīninga testus, tomēr negatīvi *in vitro* rezultāti nav pierādījums, ka testa viela nav neirotoksiska.

Skatīt vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Fosforganiskas vielas iekļauj organofosforskābes, organofosfonskābes vai organofosforamīdskābes vai radniecīgus tiofosforskābes, tiofosfonskābes vai tiofosforamīdskābes nelādētus fosforganiskos esterus, tioesterus vai anhidrīdus, vai citas vielas, kas var izraisīt aizkavētu neirotoksicitāti, kura dažreiz ir novērojama šajā vielu klasē.

Aizkavēta neirotoksicitāte ir sindroms, kas saistīts ar paildzinātu, aizkavētu ataksijas parādīšanos, muguras smadzeņu un perifērā nerva distālām aksonopātijām un ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanu un novecošanu nervu audos.

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielu var pārbaudīt ar pozitīvu kontroles grupu kā līdzekli, lai parādītu, ka laboratorijas testa apstākļos testa sugas atbildes reakcijas nav ievērojami mainījušās.

Plaši lietotas neirotoksiskas vielas piemērs ir tri-o-tolilfosfāts (*CAS* 78-30-8, *Einecs* 201-103-5, *CAS* nomenklatūra: fosforskābes tris(2-metilfenil)esteris, pazīstams arī kā tris-o-krezilfosfāts.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielu ievada perorāli vienā devā mājas vistām, kas attiecīgā gadījumā ir aizsargātas no akūtas holīnerģiskas ietekmes. Dzīvniekus novēro 21 dienu, vai neparādās izturēšanās anomālijas, ataksija un paralīze. Pēc nejaušas izvēles no katras grupas izraudzītām vistām izdara bioķīmiskos mērījumus, jo īpaši ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanu, parasti 24 un 48 stundas pēc dozēšanas. 21 dienu pēc iedarbības atlikušās vistas nogalina un izdara izraudzītu nervu audu histopatoloģiskos izmeklējumus.

▼B

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Sagatavošanās**

Jaunas veselas pieaugušas vistas, kam nav traucējošu vīrusu slimību un kas nesaņem medikamentus, un kam nav nenormāla gaita, pēc nejaušās izvēles iedala vielas saņemšanas un kontroles grupās un aklimatizē laboratorijas apstākļos vismaz piecas dienas pirms pētījuma sākšanas.

Jāizmanto būri vai norobežojumi, kas ir pietiekami plaši, lai vistas varētu brīvi kustēties un to gaita būtu viegli novērojama.

Testa vielu parasti dozē perorāli, izmantojot mākslīgo barošanu, želatīna kapsulas vai līdzīgu metodi. Šķidrumus var dot neatšķaidītus vai izšķīdinātus piemērotā nesējā, piemēram, kukurūzas eļļā; cietas vielas, ja iespējams, ir jāizšķīdina, jo lielas cietu vielu devas želatīna kapsulās var efektīvi neuzsūkties. Ir jāzina neūdens nesēju toksiskās īpašības un, ja tās nav zināmas, tad jānosaka pirms testa.

1.5.2. **Testa apstākļi**

1.5.2.1. Testa dzīvnieki

Ir ieteicams izmantot jaunas pieaugušas mājas dējējvistas (*Gallus gallus domesticus*), 8 līdz 12 mēnešus vecas. Ir jāizmanto standartlieluma šķirnes un līnijas, un vistām parasti jābūt izaudzētām apstākļos, kas ļauj brīvi kustēties.

1.5.2.2. Skaits un dzimums

Papildus vielas saņemšanas grupai ir jāizmanto nesēja kontroles grupa un pozitīvā kontroles grupa. Ar nesēja kontroles grupu ir jārīkojas tāpat kā ar vielas saņemšanas grupu, izņemot to, ka netiek ievadīta testa viela.

Katrā vistu grupā ir jāizmanto pietiekams putnu skaits tā, lai vismaz sešus putnus varētu nogalināt bioķīmiskajām noteikšanām (trīs katrā no diviem laika punktiem) un seši varētu izdzīvot 21 dienu ilgā pataloģiju novērošanas laikposmā.

Pozitīvo kontroles grupu var testēt vienlaikus vai arī tā var būt nesena agrākā kontroles grupa. Tajā ir jābūt vismaz sešām vistām, kas saņēmušas zināmu aizkavētas iedarbības neirotoksisku vielu, trim vistām bioķīmiskajiem izmeklējumiem un trim vistām pataloģiju izmeklējumiem. Ir ieteicams regulāri atjaunināt agrākos datus. Ir jāizveido jauni pozitīvas kontroles dati, ja testēšanas laboratorijā ir mainījusies kāda būtiska testa izdarīšanas sastāvdaļa (piemēram, līnija, barība, turēšanas apstākļi).

▼B

1.5.2.3. Devu līmeņi

Lai noteiktu galvenajā pētījumā izmantojamo līmeni, ir jāizdara iepriekšējs pētījums, izmantojot grupas ar piemērotu vistu skaitu un devu līmeņiem. Šajā iepriekšējā pētījumā parasti ir vajadzīga neliela letalitāte, lai noteiktu galvenajam pētījumam piemērotu devu. Tomēr, lai novērstu nobeigšanos akūtu holīnerģisku ietekmju dēļ, var izmantot atropīnu vai citu aizsargājošu līdzekli, par ko ir zināms, ka tas netraucē aizkavētas neirotoksiskas atbildes reakcijas. Lai novērtētu maksimālo neletālo testa vielas devu, var izmantot dažādas testa metodes (skatīt B.1.a metodi). Devas izvēlē noderīgi var būt arī agrākie dati par vistām vai cita toksikoloģijas informācija.

Testa vielas devas līmenim galvenajā pētījumā jābūt iespējami augstam, ņemot vērā devas izvēles iepriekšējā pētījuma rezultātus un augšējo robežas devu 2 000 mg/kg ķermeņa svara. Mirstība, kas var būt sastopama, nedrīkst izjaukt pietiekama skaita dzīvnieku izdzīvošanu bioķīmiskajām analīzēm (seši) un histoloģiskajām analīzēm (seši) 21 dienas laikā. Tomēr, lai novērstu nobeigšanos akūtu holīnerģisku ietekmju dēļ, var izmantot atropīnu vai citu aizsargājošu līdzekli, par ko ir zināms, ka tas netraucē aizkavētas neirotoksiskas atbildes reakcijas.

1.5.2.4. Pieļaujamā daudzuma tests

Ja novērojamu toksisku ietekmi neizraisa tests ar devas līmeni vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, izmantojot procedūras, kas aprakstītas šā pētījuma izdarīšanai, un ja toksicitāte nav sagaidāma, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām, tad pētījumu ar lielāku devu var uzskatīt par nevajadzīgu. Pieļaujamā daudzuma testu pielieto, izņemot gadījumus, ja iedarbība uz cilvēkiem norāda, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis.

1.5.3. Novērošanas laikposms

Novērošanas laikposms ir 21 diena.

1.5.4. **Procedūra**

Pēc aizsargājoša līdzekļa ievadīšanas, lai novērstu nobeigšanos akūtas holīnerģiskas ietekmes dēļ, vienā devā ievada testa vielu.

Vispārīgi novērojumi

Novērošana jāuzsāk tūlīt pēc pakļaušanas iedarbībai. Pirmo divu dienu laikā visas vistas ir rūpīgi jānovēro vairākas reizes un pēc tam vismaz reizi dienā 21 dienu laika posmā līdz plānotajai nogalināšanai. Ir jāprotokolē visas toksicitātes pazīmes, iekļaujot nenormālas izturēšanās parādīšanos, veidu, smagumu un ilgumu. Ataksija ir jānovērtē, izmantojot kārtas gradāciju skalu, kas sastāv no vismaz četriem līmeņiem, un jādokumentē paralīze. Vismaz divreiz nedēļā vistas, kas atlasītas patoloģiju pētījumiem, ir jāizņem no būriem un jāpakļauj pastiprinātas kustību aktivitātes laika posmam, piemēram, kāpšanai pa kāpnēm, lai atvieglotu minimālu toksisko ietekmju novērošanu. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir smagas ciešanas, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina un jāizdara autopsija.

▼B

Ķermeņa svars

Visas vistas ir jānosver tieši pirms testa vielas ievadīšanas un vismaz reizi nedēļā pēc tam.

Bioķīmija

Pēc nejaušās izvēles izraudzītas sešas vistas no vielas saņemšanas grupas un sešas vistas no nesēja kontroles grupas, un trīs vistas no pozitīvās kontroles grupas (ja šo grupu pēta paralēli) jānogalina dažas dienas pēc dozēšanas, un galvas smadzenes un muguras smadzenes jāsagatavo un jāanalizē, lai noteiktu ar neiropātiju saistītās esterāzes kavēšanas aktivitāti. Turklāt var arī būt noderīgi sagatavot un analizēt sēžas nerva audus, lai noteiktu ar neiropātiju saistītās esterāzes kavēšanas aktivitāti. Parasti trīs putnus no kontroles grupas un no katras vielas saņemšanas grupas nogalina pēc 24 stundām un trīs pēc 48 stundām, bet trīs pozitīvās kontroles grupas vistas nogalina pēc 24 stundām. Ja intoksikācijas klīnisko pazīmju novērošana (tās bieži var novērtēt, novērojot holīnerģisko pazīmju parādīšanās laiku) norāda, ka toksiskā viela var izdalīties ļoti lēni, tad var būt vēlams ņemt audu paraugus no trim putniem divos citos laikos starp 24 un 72 stundām pēc dozēšanas.

Šiem paraugiem var izdarīt arī acetilholīnesterāzes (AchE) analīzes, ja to uzskata par lietderīgu. Tomēr *in vivo* var notikt spontāna AchE reaktivācija, un tādēļ vielas spēju kavēt AchE var novērtēt par zemu.

Autopsija

Visu dzīvnieku (plānoti nogalināto un mirstošo nogalināto) autopsijā ir jāiekļauj galvas smadzeņu un muguras smadzeņu izskata novērojumi.

Histopatoloģiskie izmeklējumi

Novērošanas laika posmā izdzīvojušo un bioķīmiskos pētījumos neizmantoto dzīvnieku nervu audi ir jāizmeklē mikroskopā. Audi ir jāfiksē *in situ*, izmantojot perfūzijas metodi. Audu griezumos jāiekļauj *cerebellum* (vidus garengriezuma līmenī), *medulla oblongata*, muguras smadzenes un perifērie nervi. Muguras smadzeņu griezumi ir jāņem no augšējā kakla daļas segmenta, torakālās vidusdaļas un jostasvietas daļas. Ir jāņem griezumi no tibiālā nerva un tā atzaru uz *musculus gastrocnemius* distālās daļas un no sēžas nerva. Griezumi ir jāiekrāso ar piemērotām mielīnam un aksoniem specifiskām krāsvielām.

2. **DATI**

Ja šajā metodē izraudzītajos beigu punktos (bioķīmijas, histopatoloģijas un izturēšanās novērojumos) ir iegūti negatīvi rezultāti, parasti nav vajadzīga turpmāka testēšana attiecībā uz aizkavētu neirotoksicitāti. Neviennozīmīgu vai neskaidru rezultātu gadījumā attiecībā uz šiem beigu punktiem var būt vajadzīga turpmāka izvērtēšana.

Norāda datus par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati ir jāapkopo tabulas veidā, kurā katrai testa grupai parādīts dzīvnieku skaits testa sākumā, dzīvnieku skaits, kam novēroti audu bojājumi, ietekmes uz izturēšanos vai bioķīmiskas ietekmes, minēto audu bojājumu vai ietekmju veids un ilgums un dzīvnieku procentuālais daudzums atbilstīgi katra bojājuma vai ietekmes veidam un smagumam.

▼B

Šā pētījuma rezultāti ir jāvērtē, ņemot vērā izturēšanās, bioķīmisko un histopatoloģisko ietekmju un citu novēroto ietekmju biežumu, smagumu un korelācijas vielu saņēmušajās un kontroles grupās.

Skaitliskie rezultāti ir jānovērtē ar piemērotām un vispāratzītām statistikas metodēm. Izmantojamās statistikas metodes jāizvēlas, plānojot pētījumu.

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju.

3.1. Testa dzīvnieki:

— izmantotā līnija,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi u. c.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

3.2. Testa apstākļi:

— sīkas ziņas par testa vielas sagatavošanu, stabilitāti un homogēniskumu; attiecīgā gadījumā,

— nesēja izvēles pamatojums,

— sīkas ziņas par testa vielas ievadīšanu,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— devu izvēles pamatojums,

— ievadīto devu specifikācija, iekļaujot sīkas ziņas par ievadītā materiāla nesēju, tilpumu un fizikālo formu,

— aizsargājošā aģenta identifikācija un sīkas ziņas par tā ievadīšanu.

3.3. Rezultāti:

— dati par ķermeņa svaru,

— toksiskās atbildes reakcijas dati pa grupām, iekļaujot mirstību,

— klīniski novēroto pazīmju specifika, smagums un ilgums (atgriezenība vai neatgriezenība),

— bioķīmisko metožu un konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— attiecīgā gadījumā rezultātu statistiskā apstrāde.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Šī metode ir analoga ESAO TG 418.

▼B

B.38. **FOSFORORGANISKO VIELU AIZKAVĒTĀS NEIROTOKSICITĀTES 28 DIENU VAIRĀKKĀRTĒJAS DEVAS PĒTĪJUMS**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Vērtējot vielu toksisko ietekmi, ir svarīgi ņemt vērā, ka dažu klašu vielas spēj izraisīt īpaša veida neirotoksicitāti, ko nevar noteikt citos toksicitātes pētījumos. Ir novērots, ka dažas fosforganiskās vielas izraisa aizkavētu neirotoksicitāti, un tās ir jāuzskata par kandidātēm vērtēšanai.

Lai identificētu tās vielas, kas var izraisīt aizkavētu polineiropātiju, var izmantot *in vitro* skrīninga testus; tomēr *in vitro* pētījumu negatīvie rezultāti nav pierādījums, ka testa viela nav neirotoksiska.

Šis 28 dienu aizkavētās neirotoksicitātes tests sniedz informāciju par iespējamu veselības apdraudējumu, ko, sagaidāms, var radīt atkārtota iedarbība ierobežotā laika posmā. Tas sniedz informāciju par devas sakarību ar atbildes reakciju, un tajā var novērtēt nenovērotas nelabvēlīgas ietekmes līmeni, kas var būt noderīgs, lai noteiktu iedarbības drošības kritērijus.

Skatīt arī vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Fosforganiskas vielas iekļauj organofosforskābes, organofosfonskābes vai organofosforamīdskābes vai radniecīgus tiofosforskābes, tiofosfonskābes vai tiofosforamīdskābes nelādētus fosforganiskos esterus, tioesterus vai anhidrīdus vai citas vielas, kas var izraisīt aizkavētu neirotoksicitāti, kura dažreiz ir novērojama šai vielu klasei.

Aizkavēta neirotoksicitāte ir sindroms, kas saistīts ar paildzinātu, aizkavētu ataksijas parādīšanos, muguras smadzeņu un perifērā nerva distālām aksonopātijām un ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanu un novecošanu audos.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Testa vielas dienas devas perorāli ievada mājas vistām 28 dienas. Dzīvniekus novēro vismaz reizi dienā attiecībā uz izturēšanās anomālijām, ataksiju un paralīzi laikā līdz 14 dienām pēc pēdējās devas. Pēc nejaušas izvēles no katras grupas izraudzītām vistām izdara bioķīmiskos mērījumus, jo īpaši ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanu, parasti 24 un 48 stundas pēc pēdējās devas. Divas nedēļas pēc pēdējās devas atlikušās vistas nogalina un izdara izraudzītu nervu audu histopatoloģiskos izmeklējumus.

▼B

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošanās**

Jaunas veselas pieaugušas vistas, kam nav traucējošu vīrusu slimību un kas nesaņem medikamentus, un kam nav nenormāla gaita, pēc nejaušās izvēles iedala vielas saņemšanas un kontroles grupās un aklimatizē laboratorijas apstākļos vismaz piecas dienas pirms pētījuma sākšanas.

Jāizmanto būri vai norobežojumi, kas ir pietiekami plaši, lai vistas varētu brīvi kustēties un to gaita būtu viegli novērojama.

Katru dienu septiņas dienas nedēļā ir jāizdara perorāla dozēšana, vēlams, ar mākslīgo barošanu vai ievadot želatīna kapsulas. Šķidrumus var dot neatšķaidītus vai izšķīdinātus piemērotā nesējā, piemēram, kukurūzas eļļā; cietas vielas, ja iespējams, ir jāizšķīdina, jo lielas cietu vielu devas želatīna kapsulās var efektīvi neuzsūkties. Ir jāzina neūdens nesēju toksiskās īpašības, un, ja tās nav zināmas, tad jānosaka pirms testa.

1.4.2. **Testa apstākļi**

Testa dzīvnieki

Ir ieteicams izmantot jaunas pieaugušas mājas dējējvistas (*Gallus gallus domesticus*), 8 līdz 12 mēnešus vecas. Ir ieteicams izmantot standartlielumu, šķirnes un līnijas, un vistām parasti jābūt izaudzētām apstākļos, kas ļauj brīvi kustēties.

Skaits un dzimums

Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un nesēja kontroles grupa. Ar nesēja kontroles grupu ir jārīkojas tāpat kā ar vielas saņemšanas grupu, izņemot testa vielas ievadīšanu.

Katrā putnu grupā ir jāizmanto pietiekams vistu skaits tā, lai vismaz sešus putnus varētu nogalināt bioķīmiskajām noteikšanām (trīs katrā no diviem laika punktiem) un seši putni varētu izdzīvot 14 dienu ilgā patoloģiju novērošanas laikposmā pēc vielas došanas.

Devu līmeņi

Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā trīs aizkavētās neirotoksicitātes akūtā testa rezultātus vai par testa savienojumu pieejamos kinētikas datus. Augstākais devas līmenis ir jāizvēlas ar mērķi izraisīt toksiskas ietekmes, vēlams, aizkavēto neirotoksicitāti, bet ne nobeigšanos vai acīm redzamas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas devu līmeņi lejupejošā secībā, lai parādītu visas ar devām saistītās atbildes reakcijas un lai zemākais devas līmenis būtu nenovērotas nelabvēlīgas ietekmes līmenis.

▼B

Pieļaujamā daudzuma tests

Ja novērojamu toksisku iedarbību neizraisa tests ar devas līmeni vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, izmantojot procedūras, kas aprakstītas šā pētījuma izdarīšanai, un ja toksicitāte nav sagaidāma, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām, tad pētījumu ar lielāku devu var uzskatīt par nevajadzīgu. Pieļaujamā daudzuma testu pielieto, izņemot gadījumus, ja iedarbība uz cilvēkiem norāda, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis.

Novērošanas laikposms

Visi dzīvnieki ir jānovēro vismaz reizi dienā pakļaušanas iedarbībai laikposmā un 14 dienas pēc tā, izņemot plānoto autopsiju.

1.4.3. **Procedūra**

Dzīvniekiem testa vielu ievada katru dienu septiņas dienas nedēļā 28 dienu laikposmā.

Vispārēji novērojumi

Novērošana jāuzsāk tūlīt pēc vielas ievadīšanas sākuma. Visas vistas ir rūpīgi jānovēro vismaz reizi dienā katrā no 28 dozēšanas dienām un 14 dienas pēc dozēšanas vai līdz plānotai nogalināšanai. Ir jāprotokolē visas toksicitātes pazīmes, iekļaujot to parādīšanās laiku, veidu, smagumu un ilgumu. Novērojumos ir jāiekļauj izturēšanās anomālijas, bet ar tām nav jāierobežojas. Ataksija ir jānovērtē, izmantojot kārtas gradāciju skalu, kas sastāv no vismaz četriem līmeņiem, un jādokumentē paralīze. Vismaz divreiz nedēļā vistas ir jāizņem no būriem un jāpakļauj pastiprinātas kustību aktivitātes laika posmam, piemēram, kāpšanai pa kāpnēm, lai atvieglotu minimālu toksisko ietekmju novērošanu. Mirstoši dzīvnieki un dzīvnieki, kam ir smaga briesmu sajūta vai ciešanas, ja tie ievēroti, ir jāizņem, humāni jānogalina un jāizdara autopsija.

Ķermeņa svars

Visas vistas ir jānosver tieši pirms testa vielas pirmās ievadīšanas un vismaz reizi nedēļā pēc tam.

Bioķīmija

Pēc nejaušās izvēles izraudzītas sešas vistas no vielas saņemšanas grupas un sešas vistas no nesēja kontroles grupas jānogalina dažas dienas pēc pēdējās devas, jāpreparē galvas smadzenes un muguras smadzenes, un tajās jāanalizē ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanas aktivitāte. Turklāt var arī būt noderīgi sagatavot un analizēt sēžas nerva audus, lai noteiktu ar neiropātiju saistītās esterāzes (NTE) kavēšanas aktivitāti. Parasti pa trim putniem no kontroles grupas un no katras vielas saņemšanas grupas nogalina pēc 24 stundām un pa trim putniem pēc 48 stundām pēc pēdējās devas. Ja akūtā pētījuma vai citu pētījumu (piemēram, toksikokinētikas) dati norāda, ka vēlami ir citi nogalināšanas laiki pēc pēdējās dozēšanas, tad šie laiki ir jālieto, un pamatojums jādokumentē.

Šiem paraugiem var izdarīt arī acetilholīnesterāzes (AchE) analīzes, ja to uzskata par lietderīgu. Tomēr *in vivo* var notikt spontāna AchE reaktivācija, un tādēļ vielas spēju kavēt AchE var novērtēt par zemu.

▼B

Autopsija

Visu dzīvnieku (plānoti nogalināto un mirstošo nogalināto) autopsijā ir jāiekļauj galvas smadzeņu un muguras smadzeņu izskata novērojumi.

Histopatoloģiskie izmeklējumi

Novērošanas laika posmā izdzīvojušo un bioķīmiskos pētījumos neizmantoto dzīvnieku nervu audi ir jāizmeklē mikroskopā. Audi ir jāfiksē *in situ*, izmantojot perfūzijas metodi. Audu griezumos jāiekļauj *cerebellum* (vidus garengriezuma līmenī), *medulla oblongata*, muguras smadzenes un perifērie nervi. Muguras smadzeņu griezumi ir jāņem no augšējā kakla daļas segmenta, torakālās vidusdaļas un jostasvietas daļas. Ir jāņem griezumi no tibiālā nerva un tā atzaru uz *musculus gastrocnemius* distālās daļas un no sēžas nerva. Griezumi ir jāiekrāso ar piemērotām mielīnam un aksoniem specifiskām krāsvielām. Sākotnēji visu kontroles grupas un lielākās devas grupas dzīvnieku konservētajiem audiem jāizdara mikroskopiskā izmeklēšana. Ja lielākās devas grupā ir ietekmes pierādījumi, ir jāizdara mikroskopiskā izmeklēšana arī vidējās un zemākās devas grupu vistām.

2. **DATI**

Ja šajā metodē izraudzītajos beigu punktos (bioķīmijas, histopatoloģijas un izturēšanās novērojumos) ir iegūti negatīvi rezultāti, parasti nav vajadzīga turpmāka testēšana attiecībā uz aizkavēto neirotoksicitāti. Neviennozīmīgu vai neskaidru rezultātu gadījumā attiecībā uz šiem beigu punktiem var būt vajadzīga turpmāka izvērtēšana.

Jānorāda dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati ir jāapkopo tabulas veidā, kurā katrai testa grupai parādīts dzīvnieku skaits testa sākumā, dzīvnieku skaits, kam novēroti audu bojājumi, ietekmes uz izturēšanos vai bioķīmiskas ietekmes, minēto audu bojājumu vai ietekmju veids un ilgums un dzīvnieku procentuālais daudzums atbilstīgi katra bojājuma vai ietekmes veidam un smagumam.

Šā pētījuma rezultāti ir jāvērtē, ņemot vērā izturēšanās, bioķīmisko un histopatoloģisko ietekmju un citu novēroto ietekmju biežumu, smagumu un korelācijas katrā vielu saņēmušajā grupā un kontroles grupā.

Skaitliskie rezultāti ir jānovērtē ar piemērotām un vispāratzītām statistikas metodēm. Statistikas metodes jāizvēlas, plānojot pētījumu.

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, iekļauj šādu informāciju.

3.1. Testa dzīvnieki:

— izmantotā līnija,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi u. c.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

▼B

3.2. Testa apstākļi:

— sīkas ziņas par testa vielas sagatavošanu, stabilitāti un homogēniskumu attiecīgā gadījumā,

— nesēja izvēles pamatojums,

— sīkas ziņas par testa vielas ievadīšanu,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— devu izvēles pamatojums,

— devu specifikācija, iekļaujot sīkas ziņas par ievadītā materiāla nesēju, tilpumu un fizikālo formu,

— citu laiku izvēles pamatojums bioķīmiskajām noteikšanām, ja tie nav 24 un 48 stundas.

3.3. Rezultāti:

— dati par ķermeņa svaru,

— toksiskās atbildes reakcijas dati pa devu līmeņiem, iekļaujot mirstību,

— nenovērojamas nelabvēlīgas ietekmes līmenis,

— klīnisko novērojumu specifika, smagums un ilgums (atgriezenība vai neatgriezenība),

— bioķīmisko metožu un konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— autopsijas konstatācijas,

— visu histopatoloģisko konstatāciju sīki izstrādāts apraksts,

— attiecīgā gadījumā rezultātu statistiskā apstrāde.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Šī metode ir analoga ESAO TG 419.

▼B

B.39. NEPROGRAMMĒTAS DNS SINTĒZES (UDS) TESTS AR ZĪDĪTĀJU AKNU ŠŪNĀM *IN VIVO*

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 486 metodes "Neprogrammētas DNS sintēzes (UDS) tests ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo*" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Neprogrammētas DNS sintēzes (UDS) testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* identificē testa vielas, kas izraisa DNS reparācijas ar tām apstrādāto dzīvnieku aknu šūnās (1) (2) (3) (4).

Šis *in vivo* tests ir metode vielu genotoksiskās iedarbības pētīšanai aknās. Testā noteiktais rādītājs liecina par DNS bojājumiem un tiem sekojošām reparācijām aknu šūnās. Aknas parasti ir galvenā vieta, kurā notiek uzņemto vielu metabolisms. Tādējādi tā ir piemērota vieta DNS bojājumu noteikšanai *in vivo*.

Gadījumos, kad noskaidrots, ka testa viela mērķaudos nenonāk, šo testu neizmanto.

Neprogrammētu DNS sintēzi (UDS) novērtē, nosakot iezīmētu nukleozīdu uzņemšanu šūnās, kurās nenotiek programmēta (S-fāzes) DNS sintēze. Plašāk izmanto ar tritiju iezīmēta timidīna (^{3}H-TdR) uzņemšanas noteikšanu ar autoradiogrāfijas metodi. Neprogrammētas DNS sintēzes *in vivo* testam piemērotākās ir žurku aknas. Var izmantot arī citu orgānu audus, kas nav šīs metodes objekts.

Neprogrammētas DNS testa atbildes reakcijas noteikšana ir atkarīga no bojājuma vietā izgriezto un ievietoto DNS bāzu skaita. Tāpēc neprogrammētas DNS sintēzes tests ir īpaši noderīgs ķīmisko vielu izraisītu liela garuma reparāciju (no 20 līdz 30 bāzes) noteikšanai. Savukārt maza garuma reparāciju (viena līdz trīs bāzes) noteikšanas jutība ir ievērojami zemāka. Turklāt mutācijas var notikt tādēļ, ka DNS bojājumu vietās reparācija nenotiek, tā notiek nepareizi, vai arī nepareizas replikācijas dēļ. Neprogrammētas DNS sintēzes testa atbildes reakcija neliecina par reparācijas procesa pareizību. Turklāt ir iespējams, ka mutagēns reaģē ar DNS, bet DNS bojājums izgriešanas reparācijas procesā izlabots netiek. Specifiskas informācijas trūkumu par neprogrammētas DNS sintēzes testā noteikto mutagēno aktivitāti kompensē šā rādītāja jutība, jo to nosaka visā genomā.

Skatīt arī vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Šūnas, kas atrodas reparācijas procesā: kopējā kodola graudainība, kura lielāka par iepriekšnoteikto, kas jāpamato laboratorijai, kura veic testu.

Kopējā kodola graudainība (NNG): šūnu neprogrammētas DNS sintēzes kvantitatīvs novērtējums autoradiogrāfiskos UDS testos, ko aprēķina, no kodola graudu skaita (NG) atņemot citoplazmas graudu skaitu kodoliem ekvivalentās citoplazmas zonās (CG): NNG = NG – CG. NNG skaitu aprēķina atsevišķām šūnām, ko pēc tam pārrēķina uz visām šūnām kultūrā, paralēlās kultūrās u. c.

▼B

Neprogrammēta DNS sintēze (UDS): DNS reparācijas sintēze pēc tāda DNS fragmenta izgriešanas un aizvadīšanas, kurā ir bojājums, kas radies ķīmiska vai fizikāla faktora iedarbības rezultātā.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Neprogrammētas DNS sintēzes testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* indicē DNS reparācijas sintēzi pēc tāda DNS fragmenta izgriešanas un aizvadīšanas, kurā ir bojājums, kas radies ķīmiska vai fizikāla faktora iedarbības rezultātā. Testā parasti izmanto ^{3}H-TdR iekļaušanu aknu šūnu DNS, jo tām šūnu ciklā ir maz šūnu S-fāzē. Parasti ^{3}H-TdR uzņemšanu nosaka ar autogrāfiju, jo to mazāk traucē S-fāzes šūnas nekā, piemēram, šķidro scintilāciju skaitīšanu.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. Dzīvnieku sugu izvēle

Parasti izmanto žurkas, tomēr var izmantot jebkuras piemērotas sugas zīdītājus. Parasti izmanto jaunus, veselus, pieaugušus laboratorijas dzīvniekus. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

1.4.1.2. Turēšanas un barošanas nosacījumi

Izmanto vispārējos nosacījumus, kas minēti vispārīgā ievada B daļā, bet mitrumam vajadzētu būt 50 līdz 60 %.

1.4.1.3. Dzīvnieku sagatavošana

Veselus, jaunus, pieaugušus dzīvniekus pēc gadījuma izvēles principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Dzīvniekiem piešķir īpašu identifikāciju un līdz izmēģinājumu sākumam tos vismaz piecas dienas tur būros aklimatizācijai laboratorijas apstākļiem.

1.4.1.4. Testa viela/preparāts

Pirms došanas dzīvniekiem cietas testa vielas vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var dozēt tieši vai pirms dozēšanas atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. Šķīdinātājs/nesējs

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas iedarbības un tas nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, vispirms ieteicams izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus.

▼B

1.4.2.2. Kontroles

Visās testu neatkarīgajās daļās līdztekus iekļauj pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) kontroles. Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontrolgrupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

Pozitīvai kontrolei izmanto vielas, kuras izraisa neprogrammētu DNS sintēzi pie ekspozīcijas robežvērtībām, kas dod nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa. Pozitīvas kontroles vielas, kam vajadzīga metabolisma aktivācija, izmanto devās, kurām ir mērena atbildes reakcija (4). Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt uzreiz. Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Paraugu ņemšanas laiks	Viela	*CAS* Nr.	*Einecs* Nr.
Agrīniem paraugu ņemšanas termiņiem (2 līdz 4 stundas)	N-nitrozodimetilamīns	62-75-9	200-249-8
Vēlīniem paraugu ņemšanas termiņiem (12 līdz 16 stundas)	N-2-fluorēnilacetamīds (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Var izmantot arī citas piemērotas pozitīvas kontroles vielas. Pieļaujams, ka pozitīvai kontrolei tiek izmantots cits iedarbības veids nekā testa vielai.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Ņemot vērā dabiskās bioloģiskās reakcijas atšķirības uz testu, izmanto pietiekamu skaitu dzīvnieku. Katrā grupā jābūt vismaz trim analizējamiem dzīvniekiem. Gadījumos, kad uzkrāta ievērojama vēsturisko datu bāze, pozitīvās un negatīvās kontroles grupās var iekļaut tikai vienu vai divus dzīvniekus.

Ja izmēģinājuma veikšanas laikā ir pieejami citos izmēģinājumos iegūti dati par tās pašas sugas dzīvniekiem, kam izmantots tas pats iedarbības veids, un šie dati liecina, ka toksiskā iedarbība uz abu dzimumu īpatņiem būtiski neatšķiras, izmēģinājumam var izmantot tikai viena dzimuma dzīvniekus, vēlams – tēviņus. Gadījumos, kad kaitīgā iedarbība uz cilvēka organismu katram dzimumam var būt atšķirīga, piemēram, dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, izmēģinājumu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem.

1.5.2. **Apstrādes shēma**

Ar testa vielām parasti veic vienreizēju apstrādi.

1.5.3. **Devu lielums**

Parasti lieto vismaz divas devas. Kā lielāko nosaka devu, kurai ir tādas pašas toksiskās iedarbības pazīmes kā lielākajai devai, kam varētu būt letāla iedarbība pēc tāda paša devu režīma. Parasti mazākā deva ir 50 % līdz 25 % no lielākas devas.

▼B

Vielām ar specifisku bioloģisko aktivitāti maztoksiskās un netoksiskās devās (piemēram, hormoniem un mitogēniem) var būt citi devu noteikšanas kritēriji, ko katrā konkrētā gadījumā izvērtē atsevišķi. Ja atbilstošu datu trūkuma dēļ vispirms veic orientējošu izmēģinājumu, tas jāizdara tajā pašā laboratorijā, kurā veiks galveno izmēģinājumu, izmantojot tās pašas sugas un dzimuma dzīvniekus un ievērojot tādu pašu apstrādes režīmu.

Kā lielāko var noteikt arī devu, kas liecina par toksisku iedarbību uz aknām (piemēram, piknotiskajiem kodoliem).

1.5.4. **Iedarbības robežu tests**

Ja testā ar vienu vielas devu, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara, vienā vai divos paņēmienos vienā dienā toksisku iedarbību nekonstatē un pēc datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām var pamatoti uzskatīt, ka tā nav genotoksiska, pilnīgi izmēģinājumi var būt nevajadzīgi. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka devu iedarbības robežu pārbaudē jālieto lielāka deva.

1.5.5. **Devu došana**

Testa vielu parasti ievada ar mākslīgo barošanu, izmantojot kuņģa caurulīti vai piemērotu intubācijas kanulu. Var izmantot arī citus iedarbības veidus, ja šādai rīcībai ir pietiekams pamatojums. Taču nav ieteicams intraperitoniāls iedarbības veids, jo tādējādi aknas testa vielas iedarbībai var tikt pakļautas tieši, nevis caur centrālās asinsrites sistēmu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var dot, mākslīgi barojot vai injicējot, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Lielāka tilpuma lietošana par norādīto ir jāpamato. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, izmēģinājumiem lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

1.5.6. **Aknu šūnu sagatavošana**

Parasti aknu šūnas no apstrādātajiem dzīvniekiem sagatavo 12 līdz 16 stundu laikā pēc testa vielas ievadīšanas. Gadījumos, kad pēc 12 līdz 16 stundām netiek konstatēta acīm redzama pozitīva atbildes reakcija, var būt nepieciešama papildu paraugu ņemšana agrīnākos termiņos (parasti divas līdz četras stundas pēc apstrādes). Paraugus var ņemt citos termiņos gadījumos, kad tie ir pamatoti ar toksikokinētiskajiem datiem.

Zīdītāju aknu šūnu īslaicīgas kultūras iegūst, aknas *in situ* apstrādājot ar kolagenāzi un tikko disociējušajām aknu šūnām ļaujot nostiprināties uz piemērotas virsmas. No negatīvās kontroles dzīvniekiem iegūto aknu šūnu dzīvotspējai (5) jābūt vismaz 50 %.

1.5.7. **Neprogrammētas DNS sintēzes noteikšana**

Tikko izolētas zīdītāju aknu šūnas noteiktu laiku, piemēram, trīs līdz astoņas stundas, parasti inkubē barotnē, kas satur ^{3}H-TdR. Inkubēšanas perioda beigās barotni atdala no šūnām, kuras pēc tam var inkubēt barotnē, kas nesaistītas radioaktivitātes samazināšanai satur neiezīmētu timidīnu. Tad šūnas skalo, fiksē un žāvē. Ja inkubēšanas laiks ir ilgāks, nesaistītas radioaktivitātes samazināšana var nebūt vajadzīga. Priekšmetstikliņus iemērc autoradiogrāfijas emulsijā, tumsā eksponē (piemēram, 7 līdz 14 dienas ledusskapī), attīsta, iekrāso un saskaita eksponētos sudraba graudiņus. No katra dzīvnieka sagatavo divus vai trīs priekšmetstikliņus.

▼B

1.5.8. **Analīze**

Pareizai neprogrammētas DNS sintēzes novērtēšanai uz priekšmetstikliņiem sagatavotajos preparātos jābūt pietiekamam morfoloģiski normālu šūnu skaitam. Preparātos mikroskopiski nosaka acīmredzamas citotoksicitātes pazīmes (piemēram, piknozi, pazemināt radioaktīvas iezīmēšanas līmeni).

Priekšmetstikliņus pirms graudiņu skaitīšanas kodē. Parasti no viena dzīvnieka uz vismaz diviem priekšmetstikliņiem uzskaita 100 šūnas; skaits, kas mazāks par 100 šūnām no viena dzīvnieka, ir jāpamato. Graudiņus neskaita S-fāzes kodolos, bet var atzīmēt S-fāzes šūnu daļu.

Ar piemērotām metodēm pēc sudraba graudiņu izgulsnēšanās nosaka morfoloģiski normālu šūnu kodolos un citoplazmā ietvertā ^{3}H-TdR daudzumu.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Atsevišķi norāda datus par katru priekšmetstikliņu un dzīvnieku. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā. Katrai šūnai, katram dzīvniekam un katrai testa vielas devai atsevišķi aprēķina kopējo kodola graudainību (NNG), no kodola graudu skaita (NG) atņemot citoplazmas graudu skaitu kodoliem ekvivalentās citoplazmas zonās (CG). Gadījumos, kad uzskaita šūnas ar reparācijām, pamato to noteikšanas kritērijus, izmantojot iepriekš iegūtus vēsturiskos datus vai līdztekus veiktas negatīvas kontroles rezultātus. Skaitlisko rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes. Gadījumos, kad izmanto statistiskos testus, tos izvēlas un pamato pirms izmēģinājuma veikšanas.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvas un negatīvas atbildes reakcijas noteikšanas kritēriji ir:

tests ir pozitīvs, ja
- i) kopējā kodola graudainība (NNG) pārsniedz pēc laboratorijas vēsturiskajiem datiem iepriekš noteikto robežvērtību; vai
- ii) kopējā kodola graudainība (NNG) ir būtiski lielāka par vienlaicīgā kontrolē noteikto vērtību;

tests ir negatīvs, ja
- i) kopējā kodola graudainība (NNG) nepārsniedz pēc laboratorijas vēsturiskajiem datiem iepriekš noteikto robežvērtību; vai
- ii) kopējā kodola graudainība (NNG) nav būtiski lielāka par vienlaicīgā kontrolē noteikto vērtību.

▼B

Iegūtos rezultātus izvērtē no bioloģiskā viedokļa, t. i., to variācijas starp atsevišķiem dzīvniekiem, ņemot vērā devu ietekmi uz citotoksiskajām īpašībām. Kā palīglīdzekli testa rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes. Statistiskais svarīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvs rezultāts neprogrammētas DNS sintēzes testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* norāda, ka testa viela izraisa tādus DNS bojājumus zīdītāju aknu šūnās *in vivo*, ko var reparēt neprogrammētā DNS sintēzē *in vitro*. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela neizraisa šajā testā nosakāmus DNS bojājumus.

Jāizvērtē iespējamība, ka testa viela sasniedz centrālās asinsrites sistēmu un jo īpaši mērķaudus (piemēram, sistēmiska toksicitāte).

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.,

— dzīvnieku masa testa sākumā, katrā grupā norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testa apstākļi:

— pozitīvas un negatīvas (nesēja/šķīdinātāja) kontroles,

— devu intervāla noteikšanas testa rezultāti gadījumos, kad tas veikts,

— devu izvēles pamatojums,

— informācija par testa vielas sagatavošanu,

— informācija par testa vielas došanu,

— iedarbības veida izvēles pamatojums,

— metodes, ar kurām nosaka, ka testa viela nonākusi centrālajā asinsritē vai mērķaudos gadījumos, kad tas nepieciešams,

▼B

— testa vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa masas) gadījumos, kad tas nepieciešams,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— aknu šūnu preparātu un kultūru sagatavošanas metode,

— izmantotā autoradiogrāfiskā metode,

— sagatavoto priekšmetstikliņu un uzskaitīto šūnu skaits,

— novērtējuma kritēriji,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— kodolu graudainības, citoplazmas graudainības un kopējās kodola graudainības vidējie rādītāji atsevišķiem priekšmetstikliņiem, dzīvniekiem un grupām,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— toksicitātes pazīmes,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— reparācijas šūnu skaits, ja ir noteikts,

— S-fāzes šūnu skaits, ja ir noteikts,

— šūnu dzīvotspēja.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 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, p. 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, p. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, 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, p. 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, p. 21–27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, p. 553–562.

▼M8

B.40. ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: TRANSKUTĀNĀS ELEKTRISKĀS PRETESTĪBAS (TEP) TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 430 (2015) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šajā atjauninātajā testēšanas metodē B.40 aprakstīta *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas.

2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus (TM B.4, kas ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā) (2). Papildus pašreizējai testēšanas metodei B.40, attiecībā uz to, kā testēt ķimikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, validētas un kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 431) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4) pieņemtas ir citas *in vitro* testēšanas metodes, ar kurām vajadzības gadījumā iespējams arī identificēt kodīgu ķimikāliju apakškategorijas. Vairākas tādas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.56 (ekvivalenta ESAO *TG* 439 (5)) ir pieņemtas izmantošanai ādas kairinājuma testēšanā. ESAO norādījumu dokuments par Integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus moduļus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).

3. Šis testēšanas metodes apraksts pievēršas tādam cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Metodes pamatā ir žurkas ādas transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests, kurā, izmantojot ādas diskus, kodīgas vielas tiek atpazītas pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu. Attiecīgā ESAO testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2004. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu.

4. Lai izvērtētu regulatīvām vajadzībām veiktu ādas korozijas testēšanu *in vitro*, tika izdarīti pirmsvalidācijas pētījumi (7), pēc kuriem tika veikts oficiāls validācijas pētījums attiecībā uz tādu žurkas ādas TEP testēšanas metodi, ar ko novērtē kodīgumu ādai (8) (9) (10) (11). Šo pētījumu iznākums bija

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

ieteikums TEP testēšanas metodi (kas ir noteikta par validēto references metodi, VRM) izmantot regulatīvām vajadzībām kodīguma ādai novērtēšanā *in vivo* (12) (13 (14).

5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro* TEP testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veiktspējas standartu (*PS*) (15) prasībām būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša testēšanas metode būs pārskatīta un iekļauta attiecīgajā ESAO testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Validācijas pētījums (10) un citi publicēti pētījumi (16) (17) liecina, ka žurkas ādas TEP testēšanas metode spēj ādai kodīgas un nekodīgas vielas 122 vielu datubāzē atšķirt ar kopējo jutību 94 % (51/54) un specifiskumu 71 % (48/68).

8. Šī testēšanas metode attiecas uz ādas koroziju *in vitro*. Ar tās palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas testējamās ķimikālijas. Kā pierāda validācijas pētījumi (8) (9) (10) (11), viens šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nav iespējams kodīgas vielas un maisījumus sadalīt apakškategorijās atbilstoši ANO *GHS* vai *CLP*. Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no piemērojamā tiesiskā regulējuma. Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums īpaši pievēršas TM B.46. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (*IATA*) (6).

9. Validēšanā, kas ir pamatā šai testēšanas metodei, testēts daudz dažādu ķimikāliju, galvenokārt vielu, un validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija pat 60 vielas, kas aptver daždažādas ķimikāliju klases (8)(9). Raugoties pēc kopējiem datiem, kas pieejami, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķimikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus, puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Tomēr, tā kā attiecībā uz specifiskiem agregātstāvokļiem testējami objekti ar piemērotiem atsauces datiem nav viegli pieejami, jānorāda, ka validēšanā tikuši novērtēti samērā nedaudzi vaski un kodīgas cietas vielas. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja pierādījumi liecina, ka šī testēšanas metode kādai konkrētai vielu kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz konkrēto minēto kategoriju neizmanto. Turklāt, balstoties uz šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (18) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas

▼M8

metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtētas gāzes un aerosoli (8) (9). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar TEP tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

TESTA PRINCIPS

10. Testēšanas sistēmā ar diviem nodalījumiem, kurus vienu no otra nodala ādas diski, testējamo vielu uz laiku līdz 24 stundām aplicē šo ādas disku epidermālajai virsmai. Ādas diskus ņem no humāni nonāvētām 28–30 dienas vecām žurkām. Kodīgas ķimikālijas identificē pēc to spējas izraisīt *stratum corneum* normālā veseluma un barjerfunkcijas zudumu, ko mēra kā TEP pazemināšanos zem sliekšņlīmeņa (16) (sk. 32. punktu). Žurkas ādas TEP vajadzībām ir izraudzīta robežvērtība 5kΩ, balstoties uz plašiem datiem par lielu ķīmisko vielu klāstu, kur lielākā daļa vērtību nepārprotami bijusi vai nu par šo vērtību krietni augstāka (bieži vien > 10 kΩ), vai krietni zemāka (parasti < 3 kΩΩ) (16). Testējamās ķimikālijas, kas dzīvniekiem nerada ādas koroziju, bet ir vai nav kairinošas, TEP vērtību parasti nepazemina zemāk par šo robežvērtību. Bez tam, ja izmanto citus ādas preparātus vai citu aparatūru, robežvērtība var mainīties, tāpēc var būt vajadzīga papildu validācija.

11. Testēšanas procedūrā, ar ko apstiprinoši testē pozitīvus TEP rezultātus, ieskaitot vērtības apΩ, tiek iekļauts krāsvielas saistīšanas solis. Krāsvielas saistīšanas solī tiek noteikts, vai jonu caurlaidības palielinājumu izraisījusi fiziska *stratum corneum* noārdīšanās. Ir apliecināts, ka TEP metode, kurā izmanto žurkas ādu, spēj prognozēt kodīgumu B.4. testēšanas metodē, ko *in vivo* īsteno ar trušiem (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo žurkas ādas TEP testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām būtu jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā ieteiktās standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (16)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula

Standartvielu ([1]) **saraksts**

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS*/*CLP* Kategorijas, kuru pamatā ir *in vivo* rezultāti ([3])	VRM Kategorijas, kuru pamatā ir *in vitro* rezultāti	Agregātstāvoklis	pH ([4])
In vivo kodīgas vielas						
N,N'-dimetil dipropilēntriamīns	10563-29-8	organiska bāze	1.A	6 × K	Š	8,3
1,2-diaminopropāns	78-90-0	organiska bāze	1.A	6 × K	Š	8,3

▼**M8**

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase (2)	ANO *GHS*/*CLP* Kategorijas, kuru pamatā ir *in vivo* rezultāti (3)	VRM Kategorijas, kuru pamatā ir *in vitro* rezultāti	Agregātstāvoklis	pH (4)
In vivo kodīgas vielas						
sērskābe (10 %)	7664-93-9	neorganiska skābe	(1.A/)1.B/1.C	5 × K 1 × NK	Š	1,2
kālija hidroksīds (10 % ūd.)	1310-58-3	neorganiska bāze	(1.A/)1.B/1.C	6 × K	Š	13,2
oktānskābe (kaprilskābe)	124-07-2	organiska skābe	2.B/1.C	4 × K 2 × NK	Š	3,6
2-*terc*-butilfenols	88-18-6	fenols	2.B/1.C	4 × K 2 × NK	Š	3,9
In vivo nekodīgas vielas						
izostearīnskābe	2724-58-5	organiska skābe	NK:	6 × NK	Š	3,6
4-amino-1,2,4-triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	6 × NK	KV	5,5
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofīla viela	NK	6 × NK	Š	3,6
4-(metiltio)-benzaldehīds	3446-89-7	elektrofīla viela	NK	6 × NK	Š	6,8
1,9-dekadiēns	1647-16-1	neitrāla organiska viela	NK	6 × NK	Š	3,9
tetrahloretilēns	127-18-4	neitrāla organiska viela	NK	6 × NK	Š	4,5

Saīsinājumi: aq = uz ūdens bāzes; *CAS* Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; VRM = validēta references metode; K = kodīga; NK = nekodīga.

(1) Standartvielas tika izraudzītas no vielām, kuras izmantotas žurkas ādas TEP testēšanas metodes *ECVAM* validācijas pētījumā, un šeit ir sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategorijām un tad pa ķimikāliju klasēm (8) (9). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds bijis pirkumā no komerciāla piegādātāja (8). Izlasē, cik vien iespējams, ietvertas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai prognozēt ar VRM; ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumā izmantotajām ķimikāliju klasēm; iii) atspoguļo VRM veiktspējas raksturlielumus; iv) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas; un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

(2) Ķimikāliju klase, ko piešķīruši *Barratt et al.* (8).

(3) ANO *GHS/CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijai attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III.

(4) pH vērtības iegūtas no *Fentem et al.* (9) un *Barratt et al.* (8).

▼**M8**

PROCEDŪRA

13. Uz žurkas ādas TEP balstītās ādas korozijas testēšanas metodes sakarā ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (19). Šīs testēšanas metodes aptvertajām uz žurkas ādas TEP ādas balstītajām korozijas testēšanas metodēm būtu jāatbilst šādiem nosacījumiem:

Dzīvnieki

14. Būtu jāizmanto žurka, jo tās ādas jutība pret vielām šajā testēšanas metodē ir jau iepriekš pierādīta (10) un žurka ir vienīgais oficiāli validētais ādas avots (8) (9). Sevišķi liela nozīme ir žurku vecumam (laikā, kad ņem ādu) un līnijai, lai būtu droši, ka apmatojuma folikulas ir snaudas fāzē, kāda ir pirms pieauguša dzīvnieka apmatojuma augšanas sākšanās.

15. Jauniem, apmēram 22 dienas veciem (atvasināti no *Wistar* vai līdzīga līnija) žurku vīrišķā vai sievišķā dzimuma īpatņiem uzmanīgi nocērp muguras un sānu apmatojumu. Pēc tam dzīvniekus, rūpīgi slaukot, mazgā, cirpto vietu iemērcot antibiotiku šķīdumā (kas satur, piemēram, streptomicīnu, penicilīnu, hloramfenikolu un amfotericīnu koncentrācijā, kura iedarbīgi inhibē baktēriju augšanu). Trešajā vai ceturtajā dienā pēc pirmās mazgāšanas dzīvniekus atkal mazgā ar antibiotikām, un tos izmanto triju dienu laikā pēc otrās mazgāšanas, kad pēc apmatojuma noņemšanas *stratum corneum* ir atjaunojies.

Ādas disku preparātu sagatavošana

16. 28–30 dienu vecumā dzīvniekus humāni nonāvē; vecums ir kritiski svarīgs. Tad ņem katra dzīvnieka muguras un sānu ādu, no kuras atdala zemādas taukus, tos uzmanīgi atslāņojot. Izgriež ādas diskus ar diametru apm. 20 mm. Ja pierādīts, ka pozitīvo un negatīvo kontroļu dati ir līdzvērtīgi datiem, kas iegūti, izmantojot svaigu ādu, āda var būt glabāta līdz disku izmantošanas brīdim.

17. Ādas disku novieto uz viena PTFE (politetrafluoretilēna) caurulītes gala tā, lai epidermālā virsma būtu kontaktā ar caurulīti. Pāri caurulītes galam ādas fiksēšanai uzmauc gumijas gredzenu, liekos audus nogriež. Pēc tam gumijas gredzena piestiprinājuma vietu PTFE caurulītei hermetizē, rūpīgi apziežot ar vazelīnu. Caurulīti ar atsperīgu spaili nostiprina receptora kamerā, kurā ir $MgSO_4$ šķīdums (154 mM) (1. attēls). Ādas diskam jābūt pilnīgi iegremdētam $MgSO_4$ šķīdumā. No vienas žurkas ādas var iegūt 10–15 diskus. Caurulītes un gredzena izmēri norādīti 2. attēlā.

18. Pirms sākt testēšanu, katra dzīvnieka ādai izdara kvalitātes kontroles procedūru, proti, izmēra divu ādas disku TEP. Lai pārējos diskus varētu izmantot testēšanas metodes vajadzībām, abu disku pretestībai jāpārsniedz 10 kΩ. Ja pretestība nesasniedz 10 kΩ, šīs ādas diski nav derīgi.

Testējamās ķimikālijas un kontrolvielu aplicēšana

19. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto paralēlas pozitīvas un negatīvas kontroles, lai būtu nodrošināta adekvāta eksperimenta modeļa veiktspēja. Katrā izpildes reizē (eksperimentā) jāizmanto tikai viena dzīvnieka ādas diski. Pozitīvai un negatīvai kontrolei ieteicams izmantot attiecīgi 10 M sālsskābes un ūdens.

▼M8

20. Šķidras testējamās vielas (150 µl) vienmērīgi aplicē uz epidermālās virsmas caurulītes iekšpusē. Testējot cietus materiālus, uz diska vienmērīgi aplicē tikdaudz cietās vielas, lai visa epidermālā virsma būtu pārklāta. Uz cietās vielas virsmas pievieno dejonizētu ūdeni (150µl) un cauruli viegli sakrata. Lai panāktu maksimālu saskari ar ādu, cietas vielas var būt jāuzsilda līdz 30 ° C, lai testējamo ķimikāliju izkausētu, padarītu mīkstāku vai sasmalcinātu, iegūstot granulveida vai pulverveida materiālu.

21. Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolķimikālijai katrā testa izpildes reizē (eksperimentā) izmanto trijus ādas diskus. Testējamās ķimikālijas aplicē uz 24 stundām 20–23 °C temperatūrā. Testējamo ķimikāliju noņem ar ūdensvada ūdens strūklu, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru, skalošanu beidzot, kad vairāk materiāla nav noņemams.

TEP mērīšana

22. Ādas pretestību mēra kā TEP, izmantojot Vitstona tiltu zemsprieguma maiņstrāvas režīmā (18). Tilta vispārīgie parametri ir darba spriegums 1–3 V, sinusoīdas veida vai taisnstūrveida maiņstrāva ar frekvenci 50–1 000 Hz un mērījumu diapazons vismaz 0,1–30 kΩ. Ar validēšanai izmantoto mērtiltu virknes vai paralēlajā slēgumā tika mērīta induktivitāte, kapacitāte un pretestība attiecīgi līdz 2 000 H, 2 000 µF un 2 MΩ pie frekvences 100 Hz vai 1 kHz. TEP kodīguma testa vajadzībām mērījumi tiek atspoguļoti virknes slēgumam kā pretestība pie frekvences 100 Hz. Pirms elektriskās pretestības mērīšanas samazina ādas virsmas spraigumu, pievienojot tādu tilpumu 70 % etanola, lai būtu pārklāta epiderma. Pēc dažām sekundēm etanolu no caurulītes izlej un audus hidratē, pievienojot 3 ml $MgSO_4$ šķīduma (154 mM). Mērtilta elektrodus novieto abās ādas diska pusēs, lai izmērītu ādas disku pretestību kΩ (1. attēls). Elektroda izmēri un elektroda daļas garums zem turētāja spailes aplūkojami 2. attēlā. Iekšējā elektroda turētāja spaile pretestības mērīšanas laikā balstās uz PTFE caurules, lai nodrošinātu, ka $MgSO_4$ šķīdumā pastāvīgi ir iegremdēts vienāds elektroda garums. Ārējais elektrods receptora kamerā tiek ievietots tādā veidā, ka elektrods balstās pret kameras dibenu. Attālums starp atsperes spaili un PTFE caurulītes apakšu nedrīkst mainīties (2. attēls), jo šis attālums ietekmē iegūto pretestības vērtību. Tātad attālumam starp iekšējo elektrodu un ādas disku jābūt nemainīgam un iespējami mazam (1–2 mm).

23. Par 20 kΩ augstāku izmērītās pretestības vērtību var radīt arī uz ādas diska epidermālās virsmas palikušas testējamās ķimikālijas paliekas. Šo pārklājumu pilnīgāk likvidēt var mēģināt, piemēram, PTFE caurulīti hermētiski aizspiežot ar cimdotu īkšķi un apm. 10 sekundes pakratot; $MgSo_4$ šķīdumu izlej un pretestības mērīšanu atkārto ar svaigu $MgSO_4$ šķīdumu.

24. Iegūtās TEP vērtības var būt ietekmējuši testēšanai izmantotās aparatūras raksturlielumi, izmēri un eksperimenta procedūra. Kodīguma slieksnis 5 kΩ atvasināts, izmantojot datus, kas iegūti ar šajā metodes aprakstā norādīto specifisko aparatūru un procedūru. Ja tiek grozīti testēšanas nosacījumi vai ja izmanto citu aparatūru, var būt piemērojamas citas sliekšņvērtības un kontrolvērtības. Tādējādi metodika un pretestības sliekšņvērtības jākalibrē, testējot virkni standartvielu, kuras izraugās no validācijas pētījumā izmantoto vielu klāsta (8) (9) vai pētāmajām vielām līdzīgu ķimikāliju klašu vielām. Piemērotu standartvielu komplekss ir norādīts 1. tabulā.

▼M8

Krāsvielu saistīšanas metodes

25. Saskarē ar noteiktiem nekodīgiem materiāliem pretestība var samazināties zem robežvērtības 5 kΩ, paverot iespēju joniem izkļūt caur *stratum corneum* un vēl samazinot elektrisko pretestību (9). Piemēram, neitrālas organiskās vielas un virsmaktīvas vielas (deterģenti, emulgatori u. c.) var noņemt ādas lipīdus, palielinot membrānas joncaurlaidību. Tāpēc, ja ar šādām ķimikālijām iegūtās TEP vērtības ir apmēram 5 kΩ vai mazākas, bet saskatāma ādas bojājuma nav, kontrolaudiem un apstrādātajiem audiem jānoteic krāsvielas penetrācija, lai noskaidrotu, vai iegūtās TEP vērtības ir ādas caurlaidības paaugstināšanās vai ādas korozijas rezultāts (7) (9). Pēdējā gadījumā, ja ir *stratum corneum* pārrāvumi, audu slāni zem ādas virsmas ātri penetrē un nokrāso uz tās aplicēta krāsviela sulforodamīns B. Minētā krāsviela ir stabila pret ļoti daudzu ķīmisko vielu iedarbību, kā arī ir stabila turpmāk aprakstītajā ekstrakcijas procedūrā.

Krāsvielas sulforodamīna B aplicēšana un noņemšana

26. Pēc TEP noteikšanas magnija sulfāta šķīdumu no caurulītes izlej un uzmanīgi apskatās, vai ādai nav acīmredzamu bojājumu. Ja acīmredzama liela bojājuma (piem., perforācijas) nav, katra ādas diska epidermālajai virsmai uz divām stundām aplicē 150 µl 10 % (masa/tilp.) krāsvielas sulfurodamīna (skābais sarkanais 52; *C.I.* 45100; *CAS* numurs 3520-42-1) šķīduma destilētā ūdenī. Lai visu lieko/nesaistīto krāsvielu noņemtu, ādas diskus pēc tam apmēram 10 sekundes skalo ar ūdensvada ūdeni, kura temperatūra nepārsniedz istabas temperatūru. Katru ādas disku no PTFE caurulītes piesardzīgi izņem un ievieto mēģenē (piemēram, 20 ml stikla scintilācijas mēģenē) ar dejonizētu ūdeni (8 ml). Mēģenes uzmanīgi 5 minūtes krata, lai noņemtu vēl jebkādu nesaistītu krāsvielu. Pēc tam skalošanas procedūru atkārto, tad ādas diskus izņem un ievieto mēģenēs ar 5 ml nātrija dodecilsulfāta (NDS) 30 % šķīdumu destilētā ūdenī un 60 °C temperatūrā inkubē līdz nākamajai dienai.

27. Pēc inkubācijas visus ādas diskus izņem un atmet, bet šķīdumu 8 minūtes centrifugē 21 °C temperatūrā (relatīvais centrbēdzes spēks ~ 175 × g). Paraugu, kurā ir 1 ml supernatanta, 1:5 (tilp./tilp) (t. i., 1 ml + 4 ml) atšķaida ar 30 % (masa/tilp) NDS šķīdumu destilētā ūdenī. Mēra šķīduma optisko blīvumu (OB) pie 565 nm.

Krāsvielas satura aprēķināšana

28. Krāsvielas sulforodamīna B saturu diskā aprēķina pēc OB vērtībām (9) (sulforodamīna B krāsvielas molārās ekstinkcijas koeficients pie 565 nm = 8,7 × $l0^4$; molekulmasa = 580). Krāsvielas saturu katram ādas diskam nosaka, izmantojot attiecīgo kalibrēšanas līkni, un pēc tam replikātiem aprēķina krāsvielas vidējo saturu.

Pieņemamības kritēriji

29. Vidējie TEP rezultāti ir derīgi, ja paralēlās pozitīvās un negatīvās kontroles vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami testēšanas laboratorijā. Pieņemamie pretestības diapazoni attiecībā uz iepriekš aprakstīto metodoloģiju un aparātu ir norādīti šajā tabulā:

▼**M8**

Kontrole	Viela	Pretestības diapazons (KΩ)
pozitīvā	1 M sālsskābes	0,5–1,0
negatīvā	Destilēts ūdens	10–25

30. Vidējie krāsvielas saistīšanas rezultāti derīgi ar nosacījumu, ka paralēlo kontroļu vērtības atbilst diapazoniem, kas attiecībā uz šo metodi ir pieņemami. Ieteicamie pieņemamie krāsvielas satura diapazoni kontrolvielām, kuras izmanto ar augstāk aprakstīto metodoloģiju un aparatūru, norādīti šajā tabulā:

Kontrole	Viela	Krāsvielas satura diapazons (µg/disks)
pozitīvā	1 M sālsskābes	40–100
negatīvā	Destilēts ūdens	15–35

Rezultātu interpretēšana

31. Šo testēšanas metodi optimizējot, noteikta, pirmsvalidācijas fāzē testēta un oficiālā validācijas pētījumā apstiprināta tika TEP robežvērtība, pie kuras kodīgas ķimikālijas tiek nošķirtas no nekodīgām.

32. Ar ANO *GHS* / *CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz ādas korozijas testēšanas metodi, kas balstās uz žurkas ādas TEP ir sniegts zemāk:

Uzskatāms, ka testējamā ķimikālija uz ādu kodīgi neiedarbojas:

i) ja attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir lielāka par (>) 5 kΩ vai

ii) attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (>) 5 kΩ un

— ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti) un

— vidējais krāsvielas saturs uz disku ir mazāks par (<) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvās kontroles vērtībām sk. 30. punktu).

Uzskatāms, ka testējamā ķimikālija uz ādu iedarbojas kodīgi:

i) ja attiecībā uz šo testējamo ķimikāliju vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (≤) 5 kΩ un šie ādas diski ir acīmredzami bojāti (piem., perforēti) vai

ii) attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtā vidējā TEP vērtība ir mazāka par vai vienāda ar (>) 5 kΩ un

— ādas diski nav acīmredzami bojāti (piem., perforēti), bet

▼M8

— vidējais krāsvielas saturs uz disku ir lielāks par vai vienāds ar (≥) vidējo krāsvielas saturu uz disku, kāds ir paralēlajai 10 M HCl pozitīvajai kontrolei (attiecībā uz pozitīvajām kontrolvērtībām sk. 30. punktu).

33. Vienai atsevišķai testēšanas reizei (eksperimentam) ar vismaz trim ādas disku replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kur testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējais TEP ir 5 ± 0,5 kΩ, jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize (eksperiments), kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja abu pirmo divu testēšanas reižu (eksperimentu) rezultāti nesakrīt.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

34. Attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas pretestības vērtības (kΩ) un krāsvielas satura vērtības (µg uz disku) būtu jāatspoguļo tabulas veidā, ieskaitot datus par katru atsevišķo replikāta disku katrā testēšanas reizē (eksperimentā) un vidējās vērtības ± standartnovirze. Jāatspoguļo visi eksperimentu atkārtojumi. Attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju ziņojumā būtu jāatspoguļo novērotie ādas disku bojājumi.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles ķimikālijas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi iespējami izsmeļoši raksturotas pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā līnija un dzimums;

— par donordzīvniekiem izmantoto dzīvnieku vecums;

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.;

— detalizēta informācija par ādas preparātu sagatavošanu.

▼**M8**

Testēšanas nosacījumi:

— testēšanas iekārtu kalibrēšanas līknes;

— krāsvielas saistīšanas testa izpildes kalibrācijas līknes, OB mērīšanai izmantotās vērtības un attiecīgā gadījumā mērierīces (piem., spektrofotometra) OB linearitātes diapazons;

— detalizēta informācija par TEP mērīšanai izmantoto testēšanas procedūru;

— attiecīgā gadījumā — detalizēta informācija par krāsvielas saistīšanas noteikšanai izmantoto procedūru;

— testā izmantotās devas, ekspozīcijas perioda vai periodu ilgums un ekspozīcijas temperatūra vai temperatūras;

— detalizēta informācija par mazgāšanas procedūru, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda;

— uz vienu testējamo ķimikāliju un uz kontrolēm (pozitīvo un negatīvo kontroli) izmantoto replicēto ādas disku skaits;

— testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas;

— norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz:

  i) pozitīvās un negatīvās kontroles TEP vērtību (izteiktas kΩ) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles pretestības diapazoniem,

  ii) pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura vērtību (izteiktas μg/disc) pieņemamība ar norādi uz pozitīvās un negatīvās kontroles krāsvielas satura diapazoniem,

  iii) testa rezultātu pieņemamība ar norādi uz ādas disku replikātu vēsturisko mainību;

— izmantoto lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeļa apraksts.

Rezultāti:

— tabulas veidā apkopoti TEP un krāsas saistīšanas testu (attiecīgā gadījumā) dati par atsevišķām testējamām ķimikālijām un kontrolēm, sniegti par katru testēšanas reizi (eksperimentu) un katru ādas diska replikātu (pa atsevišķiem dzīvniekiem un atsevišķiem ādas paraugiem, vidējās vērtības, standartnovirze un variācijas koeficients;

— apraksts par jebkādu novērotu ietekmi;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.

(3) Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Model.

(4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.

(5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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., and 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., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.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., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.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., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (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) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (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 in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. 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., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

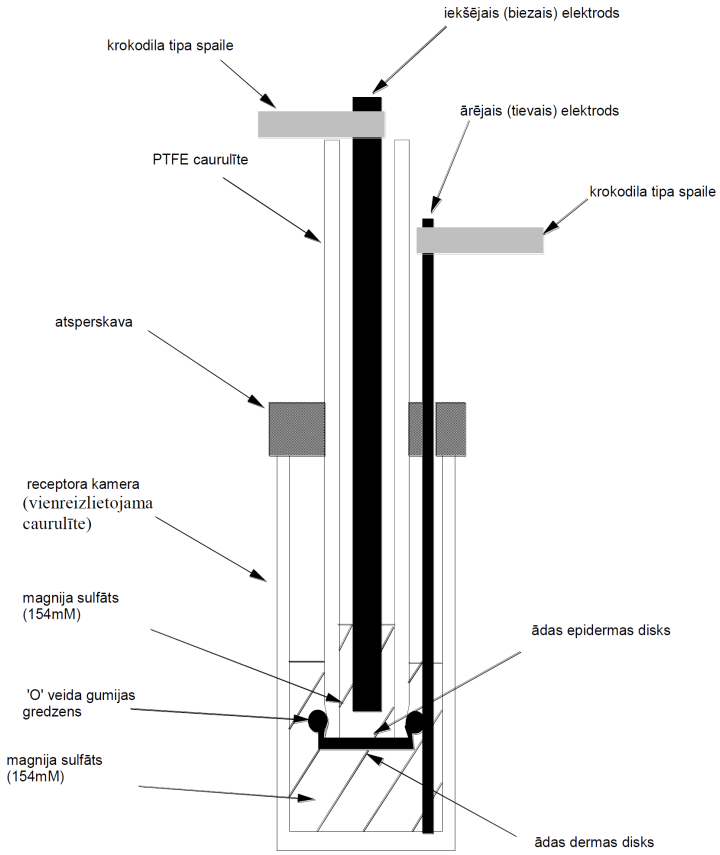
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher 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. and 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) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 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), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

1. Attēls

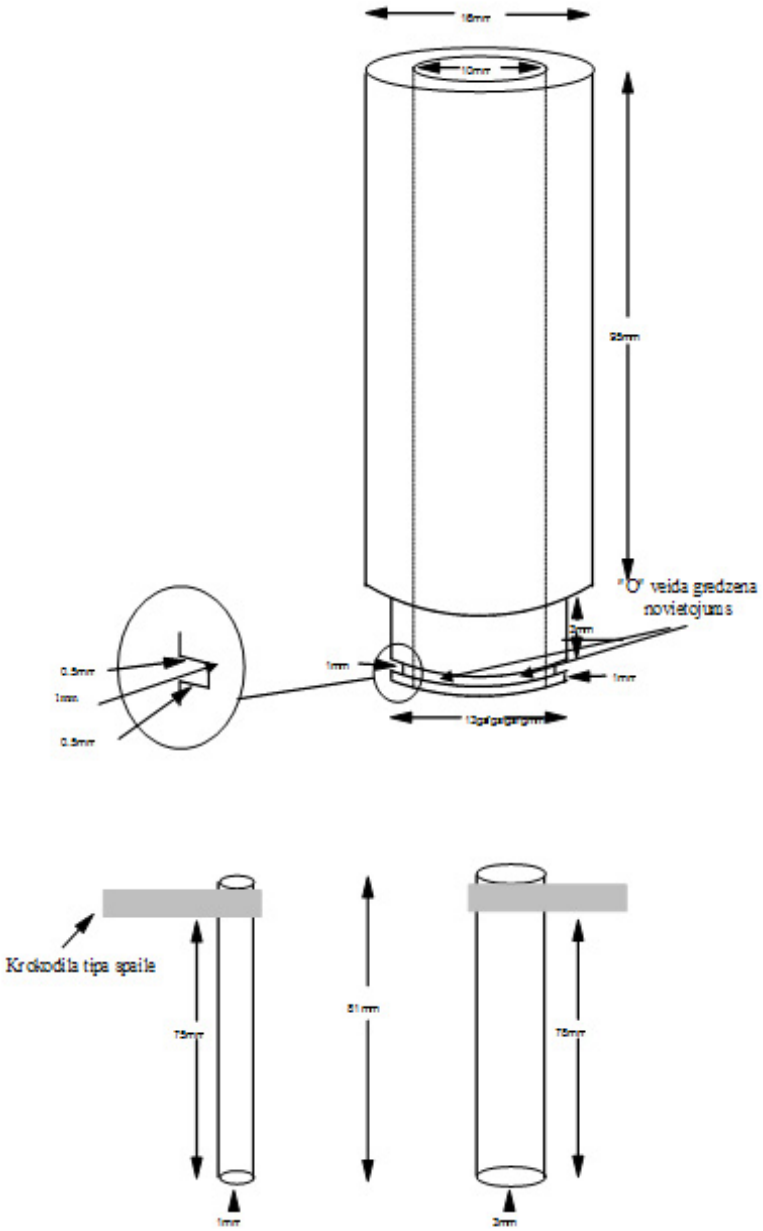
Zurkas Zdas Tep Testa Aparāts



▼**M8**

2. Attēls

Politetrafluoretilēna (PFTE) Caurulītes, Receptora Kameras Un Elektrodu Izmēri



Attēlotā aparāta darbības kritiskie faktori:

— PTFE caurulītes iekšējais diametrs,

— elektrodu garumam attiecībā pret PTFE caurulīti un receptora kameru jābūt tādam, lai elektrodi nepieskartos ādas diskam un lai elektroda standartgarums būtu saskarē ar $MgSO_4$ šķīdumu,

▼**M8**

— $MgSO_4$ šķīduma līmenim receptora kamerā jābūt tādam, lai attiecībā uz šķidruma līmeni PTFE caurulītē līmenis būtu kā 1. attēlā,

— lai elektriskās pretestības mērījums patiesi atspoguļotu ādas īpašības, ādas diskam jābūt pietiekami labi fiksētam pie PTFE caurulītes.

▼**M8**

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (20).

K: kodīga.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži vien izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (20).

***GHS* (Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma):**: sistēma, kas piedāvā ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

OD: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

▼**M8**

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: ((i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši ticamības un pareizības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testēšanas metodi var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (20).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (20).

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar dermu un radusies pēc tam, kad testējamā viela uz ādas aplicēta līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (20).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

(Testēšanas) reize: atsevišķas testējamās ķimikālijas paralēla testēšana ar vismaz trijiem replicētiem ādas diskiem.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkutānā elektriskā pretestība (TEP): ādas elektriskās pretestības mērs, kas izteikts kiloomos (kΩ). Vienkārša un robusta metode, kā novērtē barjerfunkciju, ar Vitstona tilta palīdzību reģistrējot jonu pāreju caur ādu.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.;

▼M8

B.40.a **ĀDAS KOROZIJA *IN VITRO*: REKONSTRUĒTAS CILVĒKA EPIDERMAS RhE TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 431 (2016) aprakstītajam. Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šīs atjauninātās testēšanas metodes B.40a aprakstā raksturota *in vitro* procedūra, kas dod iespēju saskaņā ar ANO *GHS* (1) un ar *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas. Ar tās palīdzību kodīgas vielas ir iespējams arī daļēji iedalīt apakškategorijās.

2. Ķimikāliju ādas korozijas radīšanas potenciāla novērtēšana parasti bijusi saistīta ar laboratorijas dzīvnieku izmantošanu (TM B.4, līdzvērtīga ESAO *TG* 404; sākotnēji pieņemta 1981. g. un pārskatīta 1992., 2002. un 2015. g. (2). Lai testētu ķimikāliju potenciālu izraisīt ādas koroziju, bez pašreizējās testēšanas metodes B.40a validētas un pieņemtas ir tādas citas *in vitro* testēšanas metodes kā TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* 430) (3) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* 435) (4). Turklāt ādas kairinājuma potenciāla testēšanai ir pieņemta *in vitro* TM B.46 (ekvivalenta ESAO TG 439) (5). ESAO norādījumu dokuments par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu apraksta vairākus moduļus, kādos grupēti informācijas avoti un analīzes instrumenti, un pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (6).

3. Šis testēšanas metodes apraksts pievēršas tādam cilvēkveselības beigupunktam kā ādas korozija. Tas paredz izmantot rekonstruētu cilvēka epidermu (*RhE*) (iegūta no nepārveidotiem no cilvēka atvasinātiem epidermas keratinocītiem), kura tuvu atdarina cilvēka ādas augšējo slāņu jeb epidermas, histoloģiskās, morfoloģiskās, bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības. Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2004. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā iekļautu papildu testēšanas metodes, kurās izmantoti *RhE* modeļi un paredzēta iespēja šīs metodes izmantot, lai uz tām balstītu kodīgu ķimikāliju iedalīšanu apakškategorijās, kā arī 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.

4. Šajā testēšanas metodē ir iekļauti četri validēti komerciāli pieejami *RhE* modeļi. Ir veikti pirmsvalidācijas pētījumi(7), pēc kuriem izdarīts oficiāls validācijas pētījums par ādas korozijas (8)(9)(10) novērtēšanu (11) (12) attiecībā uz diviem komerciāli pieejamiem testa modeļiem, *EpiSkin™ Standard Model* (SM) un *EpiDerm™ Skin Corrosivity Test* (*SCT*) (*EPI*-200) (tālākajā tekstā saukti par validētajām references metodēm — VRM). Šo pētījumu iznākumā radās ieteikums, ka divas iepriekš minētās VRM varētu izmantot regulatīvām vajadzībām, lai kodīgas (*C*) vielas atšķirtu no nekodīgām (*NC*) vielām, un ka turklāt *EpiSkin™* var izmantot par atbalstu kodīgu vielu iedalīšanā apakškategorijās (13) (14) (15). Saskaņā ar validāciju, kas balstās uz

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

PS, līdzīgus rezultātus kā VRM *EpiDerm™* ir uzrādījuši vēl divi citi komerciāli pieejami *in vitro* ādas korozijas *RhE* testa modeļi (16) (17) (18). Tie ir *SkinEthic™ RHE* ([1]) un *epiCS®* (agrākais nosaukums *EST*-1000), un arī tos var regulatīviem nolūkiem izmantot kodīgu vielu atšķiršanai no nekodīgām vielām (19)(20). Pēcvalidācijas pētījumi, ko *RhE* modeļa izstrādātāji 2012. līdz 2014. gadā izdarījuši ar precizētu protokolu, ar kura palīdzību tika koriģēta interference, ko rada testējamo ķimikāliju izraisīta nespecifiska MTT redukcija, uzlaboja gan *C/NC* atšķiršanas veiktspēju, gan atbalstu kodīgo vielu iedalīšanai apakškategorijās (21) (22). Ar *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *EpiCS®* iegūtie pēcvalidācijas dati ir tālāk statistiski izanalizēti, lai apzinātu alternatīvus prognozēšanas modeļus, kas uzlabojuši prognozētspēju attiecībā uz apakškategorizēšanu (23).

5. Pirms kādu piedāvātu līdzīgu vai modificētu *in vitro RhE* testēšanas metodi, kas nav VRM, attiecībā uz ādas koroziju iespējams izmantot regulatīvām vajadzībām, saskaņā ar veiktspējas standartu (*PS*) (24) prasībām, kuras aprakstītas saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 (25) principiem būtu jānosaka tās ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par tās līdzību VRM. Datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, ja visas jaunierosinātās vai atjauninātās VS atbilstošās testēšanas metodes būs pārskatītas un iekļautas attiecīgajā testēšanas vadlīnijā. Minētajā testēšanas vadlīnijā iekļautos testa modeļus var izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, apmierinātu valstu prasības attiecībā uz testu rezultātiem, kas iegūti ar kādu *in vitro* testēšanas metodi ādas korozijas noteikšanai.

DEFINĪCIJAS

6. Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Ar šīs testēšanas palīdzību iespējams saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* identificēt nekodīgas un kodīgas vielas un maisījumus. Šī testēšanas metode tālāk atbalsta kodīgu vielu un maisījumu apakškategorizēšanu ANO *GHS* (1) atbilstošā izvēles 1.A apakškategorijā un 1.B un 1.C apakškategorijas kombinācijā (21) (22) (23). Šo testēšanas metodi ierobežo nelielais labi zināmu 1.C apakškategorijas *in vivo* ādai kodīgu ķimikāliju kopums, tāpēc ar tās palīdzību saskaņā ar ANO *GHS* un ar *CLP* savstarpēji nošķirt "kodīgs ādai" 1.B un 1.C apakškategoriju nav iespējams. Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE* un *epiCS®* testa modeļiem (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).

8. Validācijā, kas atbalsta šajā testēšanas metodes aprakstā ietvertos testēšanas modeļus, kuri tiek izmantoti nekodīgu un kodīgu vielu identificēšanai, ķimikālijas ir testētas plašā klāstā, kurā galvenokārt pārstāvētas atsevišķas vielas; validācijas pētījuma empīriskajā datubāzē bija 60 ķimikāliju un tā aptvēra plašu ķimikāliju klašu klāstu (8) (9) (10). Testēšanas metodes izstrādātāji izdarīja testēšanu, kurā tika pierādīta testa jutība, specifiskums, pareizība

([1]) Visos uz *RhE* tehnoloģiju balstītajos modeļos izmanto saīsinājumu *RhE* (= rekonstruēta cilvēka epiderma). Modeļa *SkinEthic™* nosaukumā šis saīsinājums nozīmē to pašu, taču šīs konkrētās testēšanas metodes tirdznieciski izmantotajā nosaukumā visi saīsinājuma burti ir lielie burti.

▼M8

un intralaboratoriskā reproducējamība tādām vajadzībām kā iedalīšana apakškategorijās, un rezultātus pārskatīja ESAO (21) (22) (23). Raugoties pēc pieejamiem vispārējiem datiem, šī testēšanas metode ir piemērojama plašam ķimikāliju klašu un agregātstāvokļu klāstam, ieskaitot šķidrumus, puscietas un cietas vielas, kā arī vaskus. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Ja pierādījumi liecina, ka šie testa modeļi kādai konkrētai testēšanas metodes apraksta aptvertai testējamo ķimikāliju kategorijai nav izmantojama, to attiecībā uz minēto konkrēto kategoriju neizmanto. Turklāt, paplašinot šīs testēšanas metodes izmantojamību attiecībā uz vielām, tiek uzskatīts, ka tā izmantojama arī attiecībā uz maisījumiem. Tomēr, ņemot vērā, ka maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāva spektru un patlaban pieejams tikai nedaudz informācijas par maisījumu testēšanu, tad, ja var pierādīt testēšanas metodes nepiemērojamību konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, kas piedāvāta (26)), attiecīgo testēšanas metodi minētajai konkrētajai maisījumu kategorijai neizmanto. Pirms attiecībā uz maisījumu izmanto šo testēšanas metodi, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Validācijas pētījumos vēl nav vērtēti gāzes un aerosoli (8) (9) (10). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

9. Testējamās ķimikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķimikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var ietekmēt audu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ koriģēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles. Tas, kāda veida pielāgotas kontroles var būt vajadzīgas, var mainīties atkarībā no tā, kāda veida interferenci testējamā ķimikālija rada, un atkarībā no MTT formazāna mērīšanai izmantotās procedūras (sk. 25.–31. punktu).

10. Lai arī ar šo testēšanas metodi nevar iegūt pietiekamu informāciju par ādas kairinājumu, jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46, kura balstās uz to pašu *RhE* testēšanas sistēmu, lai gan tai ir cits protokols (5). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (6). Šajā *IATA* pieejā, pirms apsver, vai neveikt testēšanu ar dzīviem dzīvniekiem, izdara *in vitro* testus uz kodīgumu ādai (tādus, kā doti šajā metodes aprakstā) un kairinājumu ādai, Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētikas normām un nosacījumiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķimikāliju vietēji aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains cilvēka epidermas modelis. Tai ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, kā arī vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.

▼M8

12. *RhE* testēšanas metodes pamatā ir premisa, ka kodīgas ķimikālijas difūzijas vai erozijas ceļā spēj izkļūt cauri *stratum corneum* un ka tās ir citotoksiskas apakšā esošo slāņu šūnām. Šūnu dzīvotspēju mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolila zilais tetrazolija bromīds; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (27). Kodīgas ķimikālijas identificē pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zem noteiktām sliekšņvērtībām (sk. 35. un 36. punktu). Ir parādīts, ka uz *RhE* balstītā ādas korozijas testēšanas metode spēj prognozēt trušiem saskaņā ar TM B.4 novērtētu ādas korozijas ietekmi *in vivo* (2).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

13. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem *RhE* testa modeļiem sāk izmantot regulāri, laboratorijām ieteicams pierādīt tehnisko kompetenci, pareizi saklasificējot divpadsmit 1. tabulas sarakstā norādītās standartvielas. Ja izmanto metodi, kura paredzēta sīkākai klasificēšanai, jāpierāda arī, ka pareizi tiek veikta iedalīšana apakškategorijās. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (24)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

1. tabula

Standartvielu ([1]) **saraksts**

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS/CLP* kat. uz *in vivo* rezultātu bāzes ([3])	VRM kat. uz *in vitro* rezultātu ([4]) bāzes	MTT Reducētājs ([5])	Agregātstāvoklis
1.A kategorija, *In Vivo* kodīgas vielas						
brometiķskābe	79-08-3	organiska skābe	1.A	(3) 1.A	—	CV
bora trifluorīddihidrāts	13319-75-0	neorganiska skābe	1.A	(3) 1.A	—	Š
fenols	108-95-2	fenols	1.A	(3) 1.A	—	CV
dihloracetil-hlorīds	79-36-7	elektrofīla viela	1.A	(3) 1.A	—	Š
Apakškategoriju 1B-un-1C kombinācija, *In Vivo* kodīgas vielas						
glioksilskābes monohidrāts	563-96-2	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	—	S
pienskābe	598-82-3	organiska skābe	1B-un-1C	(3) 1B-un-1C	—	L
etanolamīns	141-43-5	organiska bāze	1B	(3) 1B-un-1C	jā	viskoza viela

▼**M8**

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([2])	ANO *GHS/CLP* kat. uz *in vivo* rezultātu bāzes ([3])	VRM kat. uz *in vitro* rezultātu ([4]) bāzes	MTT Reducētājs ([5])	Agregātstāvoklis
1.A kategorija, *In Vivo* kodīgas vielas						
hlorūdeņražskābe (14,4 %)	7647-01-0	neorganiska skābe	1.B-un-1.C	(3) 1.B-un-1.C	—	L
in vivo nekodīgas vielas (vielas, kas nav kodīgas)						
fenetilbromīds	103-63-9	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
4-amino-1,2,4-triazols	584-13-4	organiska bāze	NK	(3) NK	—	CV
4-(metiltio)-benzaldehīds	3446-89-7	elektrofīla viela	NK	(3) NK	jā	Š
laurīnskābe	143-07-7	organiska skābe	NK	(3) NK	—	CV

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs VRM = validēta references metode; NK = nekodīga viela; CV = cieta viela; Š = šķidrums.

([1]) Standartvielas, kas sagrupētas vispirms kodīgās un nekodīgās vielās, pēc tam pa kodīguma apakškategorijām un tad pa ķimikāliju klasēm, tika izraudzītas no vielām, kuras tika izmantotas *ECVAM EpiSkin*™ un *EpiDerm*™ validācijas pētījumos (8) (9) (10) un pēcvalidācijas pētījumos, kuru pamatā ir *EpiSkin*™ *(22), EpiDerm*™, *SkinEthic*™ un *epiCS*® izstrādātāju sagādātie dati (23). Ja nav norādīts citādi, vielas testētas tīrības līmenī, kāds piemīt komerciāli iegādātai vielai (8). Izlasē, cik vien iespējams, iekļautas vielas, kas: i) ir reprezentatīvas attiecībā uz to kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas, vāji līdz stipri kodīgas), ko iespējams mērīt vai paredzēt ar VRM, ii) ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas pētījumos izmantotajām ķimikāliju klasēm, iii) ir ar labi definētu ķīmisku struktūru, iv) ar VRM inducē reproducējamus rezultātus, v) ar *in vivo* testēšanas references metodi inducē skaidrus rezultātus; vi) ir komerciāli pieejamas un vii) nav saistītas ar augstām likvidēšanas izmaksām.

([2]) Ķimikāliju klasi piešķīruši *Barratt et al.* (8).

([3]) Attiecīgās ANO iepakojuma grupas attiecīgi priekš ANO *GHS/CLP* 1.A, 1.B un 1.C kategorijas ir ir I, II un III.

([4]) Šajā tabulā atspoguļotās VRM *in vitro* prognozes iegūtas ar testa modeļiem *EpiSkin*™ un *EpiDerm*™ (VRM) testēšanas metodes izstrādātāju veiktā pēcvalidācijas testēšanā.

([5]) *ECVAM* ādas korozijas validācijas pētījumos iegūtās vērtības, kas raksturo ādas dzīvotspēju, netika koriģētas attiecībā uz tiešo MTT redukciju (validācijas pētījumos netika izdarītas kontroles ar nonāvētiem audiem). Tomēr šajā tabulā sniegtie testēšanas metodes izstrādātāju radītie pēcvalidācijas dati iegūti ar pielāgotām kontrolēm (23).

14. Kompetences pierādīšanā lietotājam ieteicams pēc audu saņemšanas verificēt, ka to barjerīpašības atbilst *RhE* modeļa ražotāja dotajai specifikācijai. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums piegādāts no tālienes vai piegāde bijusi ilga. Kad testēšanas metode sekmīgi apgūta un kompetence tās izmantošanā pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju ieteicams joprojām novērtēt regulāri.

PROCEDŪRA

15. Tālāk vispārīgi aprakstīti šīs testēšanas metodes aptverto ādas korozijas novērtēšanai paredzēto *RhE* testēšanas modeļu komponenti un procedūras. *RhE* modeļus, kas atzīti par zinātniski derīgiem izmantošanai šajā testēšanas metodē, proti, modeļus *EpiSkin*™ *(SM), EpiDerm*™ *(EPI-200), SkinEthic*™ *RHE* un *epiCS*® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), var iegūt no komerciāliem piegādātājiem. Attiecībā uz šiem četriem *RhE* modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*), un pārskats par šo modeļu testēšanas

▼M8

metodes galvenajiem komponentiem sniegts 2. papildinājumā. Jebkuru no šiem modeļiem īstenojot un izmantojot laboratorijā, ieteicams iepazīties ar attiecīgo *SOP*. Testēšanai ar šīs testēšanas metodes aptvertajiem četriem *RhE* testēšanas modeļiem būtu jāatbilst tālāk minētajiem nosacījumiem.

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgie nosacījumi

16. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionējoša *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum, stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionāla barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (SDS) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika par 50 % samazina audu dzīvotspēju (IC_{50}), vai nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonķimikālija (sk. 18. punktu), par 50 % samazinātos šūnu dzīvotspēja (ET_{50}). *RhE* modeļa aizturētājīpašībām jābūt tādām, lai ap *stratum corneum* esošais materiāls nenokļūtu dzīvotspējīgos audos, kā dēļ var tikt nepareizi modelēta ādas ekspozīcija. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionālie nosacījumi

Dzīvotspēja

17. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT testu (27). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT spēj reducēt par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, kuras pēc tam no audiem tiek ekstrahētas ar izopropanola (vai līdzīga šķīdinātāja) starpniecību. Jau paša ekstrakcijas šķīduma optiskajam blīvumam (OB) jābūt pietiekami zemam, t. i., OB < 0,1. Ekstrahēto MTT formazānu kvantitatīvi var izteikt, vai nu izmantojot standartabsorbcijas OB mērīšanu, vai *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (38). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Četru validēto šajā testēšanas metodē iekļauto *RhE* testa modeļu negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni ir norādīti 2. tabulā. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Jādokumentē, vai visā ekspozīcijas periodā ar negatīvo kontroli apstrādātie audi kultūrā ir stabili (uzrāda tādus pašus OB rādītājus).

2. tabula

Partijas kvalitātes kontrolei paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Barjerfunkcija

18. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu noteiktu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula). *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāpierāda katras izmantotā *RhE* modeļa partijas barjerfunkcija (sk. 21. punktu).

Morfoloģija

19. *RhE* modelis būtu histoloģiski jāizmeklē, pierādot, ka tam ir vairākslāņu struktūra, kas ir tāda pati kā cilvēka epidermas struktūra un satur *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* un *stratum corneum*, un cilvēka epidermas lipīdprofilam līdzīgs lipīdprofils. *RhE* modeļa izstrādātājam/tirgotājam, piegādājot audus galalietotājam, jāiesniedz katras izmantotā *RhE* modeļa partijas histoloģisks izmeklējums, kas pierāda, ka tam piemīt vajadzīgā audu morfoloģija (sk. 21. punktu).

Reproducējamība

20. Testēšanas metodes lietotājiem būtu jāpierāda šo testēšanas metožu reproducējamība, tās izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm. Turklāt šī testēšanas metode būtu jāizmanto tikai tad, ja *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs sagādā datus, kas pierāda metodes reproducējamību, to izmantojot ilgākā laika nogrieznī ar kodīgām un nekodīgām ķimikālijām no, piem., kontrolvielu saraksta (1. tabula). Ja kādu no testēšanas metodēm izmanto iedalīšanai apakškategorijās, jāpierāda arī reproducējamība attiecībā uz iedalīšanu apakškategorijās.

Kvalitātes kontrole (QC)

21. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierādījis, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (17. punkts), *barjerfunkcija* (18. punkts) un *morfoloģija* (19. punkts). Šos datus dara pieejamus testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Kodīgu vielu klasificēšanā uzticamām prognozēm der tikai rezultāti, kas iegūti ar kvalitātes kontrolē pieņemtām audu partijām. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka *IC*50 vai *ET*50 vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Pieņemamības diapazoni attiecībā uz četriem validētajiem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula

Partiju caurlaišanas *QC* kritēriji

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™ (18 stundas ilga apstrāde ar *SDS* (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 stundas	ET_{50} = 8,7 stundas
SkinEthic™ *RHE* (1 % *Triton X-100*)(35)	ET_{50} = 4,0 stundas	ET_{50} = 10,0 stundas
epiCS® (1 % *Triton X-100*)(36)	ET_{50} = 2,0 stundas	ET_{50} = 7,0 stundas

▼M8

Testējamās ķimikālijas un kontrolķimikāliju aplicēšana

22. Uz katru testējamo ķimikāliju un kontrolēm un katru ekspozīcijas laiku jāizmanto vismaz divi audu replikāti. Testējamās ķīmiskās vielas, kas ir šķidrumi vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., vismaz 70 µl/cm^2 vai 30 mg/cm^2, raugoties, lai netiktu testēta nefiksēta deva. Atkarībā no modeļa, lai nodrošinātu iespējami labāku testējamās vielas saskari ar epidermas virsmu, testējot cietas vielas, epidermas virsma vispirms jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, un tikai tad var aplicēt vielu (34) (35) 36) (37). Ja vien iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Aplicēšanas metodei jābūt testējamai ķimikālijai piemērotai (sk., piem., atsauces (34–37)). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķimikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu uz ūdens bāzes vai 0,9 % NaCl šķīdumu. Atkarībā no tā, kurš no četriem validētajiem *RhE* testēšanas modeļiem tiek izmantots, uz katru testējamo ķimikāliju tiek izmantot divi vai trīs ekspozīcijas laiki (attiecībā uz visiem četriem derīgajiem *RhE* modeļiem 3 min un 1 h; attiecībā uz *EpiSkin*™ papildu ekspozīcijas laiks četras stundas). Atkarībā no izmantotā *RhE* testēšanas modeļa un novērtētā ekspozīcijas perioda, inkubācijas temperatūra ekspozīcijas laikā var variēt no istabas temperatūras līdz pat 37 °C.

23. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole un pozitīvā kontrole (*PC*), lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto negatīvās kontroles), barjerfunkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto *PC*) ietilpst noteiktā vēsturiskā pieņemamības diapazonā. Ierosinātās pozitīvās kontroles ķimikālijas atkarībā no izmantotā *RhE* modeļa ir ledus etiķskābe vai 8N KOH. Jāņem vērā, ka 8N KOH ir tiešs MTT reducētājs, attiecībā uz kuru varētu būt vajadzīgas 25. un 26. punktā aprakstītās pielāgotās kontroles. Ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir 0,9 % NaCl šķīdums vai ūdens.

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

24. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai šajā testēšanas metodē būtu jāizmanto MTT tests, kas ir kvantitatīvs tests (27). Audu paraugu uz 3 stundām ievieto attiecīgas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Pēc tam iegūtās zilas krāsas formazāna nogulsnes ekstrahē ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma 570 nm ar frekvenču joslas filtru, kura maksimums ir± 30 nm, vai izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 30. un 31. punktu) (38).

25. Testējamās ķimikālijas ar MTT testu var interferēties, MTT tieši reducējoties līdz zilajam formazānam un/vai notiekot krāsu interferencei, ja testējamajai ķimikālijai absorbcija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā notiek tajā pašā OB diapazonā kā formazānam (570 ± 30 nm, galvenokārt zilas un violetas ķimikālijas). Būtu jāizmanto tādas papildu kontroles, kurās detektē un ievērtē šādu testējamo ķimikāliju izraisītu potenciālo interferenci, kā, piemēram, nespecifiskās MTT redukcijas kontrole (NSMTT kontrole) un nespecifiskas krāsas kontrole (*NSC* kontrole) (sk. 26. līdz 30. punktu). Tas ir īpaši svarīgi tad, ja kāda konkrēta testējamā ķimikālija no audiem netiek pilnīgi noskalota vai izkļūst caur epidermu un tātad brīdī, kad tiek veikts dzīvotspējas tests ar MTT, atrodas šajos audos. Detalizēts apraksts, kā ievērtēt tiešo MTT reducēšanos un krāsvielu radītas interferences, atrodams testa modeļiem paredzētajās *SOP* (34) (35) (36) (37).

▼**M8**

26. Lai noteiktu tiešus MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi sagatavotai MTT "barotnei" (34) (35) (36) (37). Ja testējamo ķimikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zils/violets, uzskata, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no tā, vai mēra standartabsorbciju (OB) vai izdara *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru, tālāk jāizdara funkcionāla pārbaude ar dzīvnotnespējīgu epidermu. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču testējamo ķimikāliju tie absorbē līdzīgā daudzumā kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducētāju ķimikāliju uz vienu ekspozīcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic pilnu ādas korozijas testu. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem, atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (*% NSMTT*).

27. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada krāsainas testējamās ķimikālijas vai testējamās ķimikālijas, kuras saskarē ar ūdeni vai izopropanolu iekrāsojas, un izlemtu, vai nav vajadzīgas papildu kontroles, jāizdara testējamās ķimikālijas spektrālanalīze ūdenī (ekspozīcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāizdara vēl papildu kontroles ar krāsvielām vai arī jāizmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 30. un 31. punktu). Mērot standartabsorbciju OB, katru interferējošo krāsaino testējamo ķimikāliju vienā ekspozīcijas laikā aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem izdara visu ādas korozijas testu, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (NSC_{living}) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Sakarā ar to, ka dzīviem audiem piemīt bioloģiska mainība, par katru krāsaino testējamo ķimikāliju katrā izpildes reizē uz ekspozīcijas laiku jābūt paralēlai kontrolei NSC_{living}. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem, atņemot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamam testam inkubēti barotnē bez MTT (%NSC_{living}).

28. Mērot tādu testējamo ķimikāliju standartabsorbciju OB, par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 26. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 27. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām kontrolēm *NSMTT* un NSC_{living} jābūt arī kādam trešajam kontroļu kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testā interferējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķimikālijām, jo raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 26. punktā. Šīs testējamās ķimikālijas var piesaistīties gan dzīviem, gan nonāvētiem audiem, un tāpēc ar kontroli var *NSMTT* koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT redukciju, ko izraisījusi testējamā ķimikālija, bet arī krāsas interferenci, ko radījusi testējamās ķimikālijas piesaistīšanās nonāvētajiem audiem. Tādējādi koriģēšana attiecībā uz krāsas interferenci var notikt dubultā, jo krāsas interference, ko radījusi testējamās ķimikālijas saistīšanās ar dzīviem audiem, jau tiek koriģēta ar kontroli NSC_{living}. Lai nepieļautu varbūtību, ka krāsas interference tiek koriģēta divreiz, jāizdara trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nonāvētajos audos (*NSCkilled*). Šajā papildu kontrolē testējamo ķimikāliju uz katru ekspozīcijas laiku aplicē vismaz diviem nonāvēto audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē nevis MTT šķīdumā, bet gan barotnē. Neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju pietiek ar vienu kontroli NSC_{killed}, taču tā jāizdara paralēli kontrolei *NSMTT* un, ja iespējams, ar

▼M8

to pašu audu partiju. Pēc tam aprēķina audu faktisko dzīvotspēju, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *% NSMTT* un *% NSC_{living}* un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (*% NSC_{killed}*).

29. Svarīgi ievērot, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai, pirms regulatīvos nolūkos sākt testēt testējamas ķimikālijas, jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Ja tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju, neveicot korekciju attiecībā uz tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķimikāliju iegūtā nekoriģētā procentuālā dzīvotspēja jau ir ≤ 50 %, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķimikāliju novērtēšanai ar spektrofotometru ir lietderīgi mērīt standartabsorbciju (OB). Tomēr rezultāti attiecībā uz tādām testējamām ķimikālijām, kurām % *NSMTT* un/ vai % *NSC_{living}* > 50 % no negatīvās kontroles, jāinterpretē piesardzīgi.

30. Attiecībā uz testējamām krāsainām ķimikālijām, kuras standartabsorbcijas (OB) mērījumiem nav piemērotas, jo pārāk stipri interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 31. punktu) (37). *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēma dod iespēju MTT formazānu pirms tā kvantitatīvas noteikšanas atdalīt no testējamās ķimikālijas (38). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrija, *NSC_{living}* vai *NSC_{killed}* kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķimikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 26. punktā), ir jāizmanto *NSMTT* kontroles. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *% NSMTT*. Visbeidzot jāatzīmē, ka nav iespējams novērtēt tādus tiešus MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un kuri MTT reducē tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta OB (izmantojot standarta OB mērīšanu) vai smailes laukumi (izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.

▼M8

31. Ar jebkāda veida testējamām ķimikālijām (krāsainas, bezkrāsainas, MTT reducētājas un MTT nereducētājas) MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju (38). Tā kā *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir daudzveidīgas, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantitatīvi noteiktu MTT formazānu no audu ekstraktiem, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācija, izpildot pieņemamības kritērijus, kas noteikti attiecībā uz tādu kvalifikācijas standartparametru kopumu, kuru pamatā ir ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu aprakstītie parametri (38) (39). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Kad 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

32. Attiecībā uz jebkuru testēšanas metodi, kurā tiek izmantoti derīgi *RhE* modeļi, ar negatīvo kontroli apstrādātu audu optiskajam blīvumam vajadzētu atbilst 2. tabulā aprakstīto audu kvalitātei un tas nedrīkstētu būt mazāks par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Ar PK, proti, ledus etiķskābi vai 8N KOH apstrādātajiem audiem būtu jāatspoguļo audu spēja reaģēt uz kodīgu ķimikāliju apstākļos, kur ievēroti testēšanas modeļa nosacījumi (sk. 2. papildinājumu). Testējamai ķimikālijai un/vai kontrolķimikālijām izmantoto audu replikātu mainībai jābūt robežās, kas pieņemtas attiecībā uz katru derīgo *RhE* modeli izvirzītajās prasībās (sk. 2. papildinājumu) (piem., divu audu replikātu mainības starpība nedrīkst pārsniegt 30 %). Ja kādā izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole ir ārpus pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par nederīgu un tā jāatkārto. Ja ārpus definētā diapazona ir mainība attiecībā uz testējamām ķimikālijām, tās jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognozēšanas modelis

33. Par katru testējamo ķimikāliju iegūtās OB vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu procentuālā īpatsvara aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, audu procentuālo dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli. Procentuālās šūnu dzīvotspējas robežvērtības, kas korozīvas testējamās ķimikālijas šķir no nekorozīvām (vai dod iespēju atšķirt dažādas kodīgu vielu apakškategorijas), attiecībā uz katru šīs testēšanas metodes aptverto testa modeli ir definētas zemāk 35. un 36. punktā un šīs vērtības būtu jāizmanto rezultātu interpretēšanai.

34. Ja rezultātā iegūtā klasifikācija nav nepārprotama, attiecībā uz testējamu ķimikāliju vajadzētu pietikt ar vienu testēšanas izpildes reizi, kurā ietilpst vismaz divi audu replikāti. Tomēr, ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, ja nesakrīt replikātu mērījumi, var apsvērt, vai neveikt otru izpildes reizi, bet, ja divu pirmo izpildes reižu rezultāti nesakrīt, arī trešo.

35. Ar ANO *GHS* / *CLP* asociētais prognozēšanas modelis attiecībā uz *EpiSkin*™ ādas korozijas testēšanas modeli (9)(34)(22), ir sniegts 4. tabulā.

▼M8

4. tabula

EpiSkin™ prognozēšanas modelis

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 3, 60 un 240 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
Pēc 3 min ekspozīcijas < 35 %	**kodīga:** • fakultatīvā 1.A apakškategorija (*)
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 35 % **UN** pēc 60 min ekspozīcijas < 35 % **VAI** pēc 60 min ekspozīcijas ≥ 35 % **UN** pēc 240 min ekspozīcijas < 35 %	**kodīga:** • fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
pēc 240 min ekspozīcijas ≥ 35 %	**nekodīga**

(*) Saskaņā ar datiem, kas radīti, lai novērtētu, kā *RhE* testēšanas modeļi noder par atbalstu vielu iedalīšanai apakškategorijās, tika pierādīts, ka attiecībā uz testēšanas modeli *EpiSkin*™ apmēram 22 % 1.A apakškategorijas rezultātu faktiski var būt 1.B apakškategorijas vai 1.C apakškategorijas vielas vai maisījumi (proti, pārspīlēta klasifikācija) (sk. 3. papildinājumu).

36. Ar ANO *GHS/CLP* klasifikācijas sistēmu asociētajiem ādas korozijas testēšanas modeļiem *EpiDerm™ SCT* (10)(23)(35), *SkinEthic™ RHE* (17)(18)(23)(36), un *epiCS®* (16)(23)(37) 5. tabula sniedz prognozēšanas modeļus.

5. tabula

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE un epiCS®

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 360 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
1. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *epiCS®*	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 50 %	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 50 % **UN** Pēc 60 min ekspozīcijas < 15 %	kodīga
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 50 % **UN** Pēc 60 min ekspozīcijas ≥ 15 %	nekodīga
2. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 25 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 25 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz *SkinEthic™ RHE* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 18 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *

▼M8

Pa ekspozīcijas laikpunktiem mērītā dzīvotspēja (t = 360 minūtes)	Prognoze, ko aplūko
1. SOLIS attiecībā uz *EpiDerm™ SCT*, *SkinEthic™ RHE* un *epiCS®*	
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 18 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija
2. SOLIS attiecībā uz *epiCS®* sakarā ar vielām, kas 1. solī identificētas kā kodīgas	
Pēc 3 min ekspozīcijas < 15 %	fakultatīvā 1.A apakškategorija *
Pēc 3 min ekspozīcijas ≥ 15 %	fakultatīvo apakškategoriju 1.B un 1.C kombinācija

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru testu, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, visus datus par atsevišķajiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, datus par testējamās vielas ietekmi uz šūnu dzīvotspēju un tās klasifikācijas datus) apkopo tabulas veidā. Turklāt ziņojumā attiecībā uz katru testu būtu jāiekļauj audu replikātu dzīvotspējas un mainības koeficienta vidējās vērtības un diapazoni. Par katru testējamo ķimikāliju ziņojumā jāatspoguļo tiešu MTT reducētāju vai testējamu krāsainu ķimikāliju novērotā mijiedarbība ar MTT reaģentu.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamās un kontroles ķimikālijas:

— Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

— Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

— izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, no kura dzīvnieki saņemti, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Izmantotais RhE modelis un protokols un attiecīgās izvēles pamatojums (attiecīgā gadījumā)

Testa apstākļi:

— izmantotais *RhE* modelis (arī sērijas numurs);

▼**M8**

— MTT kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons;

— MTT formazāna kvantitatīvajai noteikšanai izmantotās metodes apraksts;

— *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā);

— pietiekama papildinformācija par izmantoto konkrēto *RhE* modeli, arī tā veiktspēju. No tiem jānorāda vismaz:

i) dzīvotspēja,

ii) barjerfunkcija,

iii) morfoloģija,

iv) reproducējamība un prognozēšanas spēja,

v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);

— norāde uz modeļa vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz kvalitātes kontroles datu pieņemamība attiecībā uz vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem,

— Apliecināta testēšanas metodes izmantošanas kompetence, kas pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, testējot standartvielas.

Testa procedūra:

— detalizēta informācija par izmantoto testēšanas procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda);

— izmantotās testējamās ķimikālijas un kontrolķimikāliju devas;

— ekspozīcijas laiks vai laiki un temperatūra vai temperatūras;

— attiecībā uz tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām krāsojošām ķimikālijām izmantotās kontroles; norādes (attiecīgā gadījumā);

— uz katru testējamo ķimikāliju un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, *NSCliving* un *NSCkilled*, attiecīgā gadījumā) izmantoto audu replikātu skaits uz vienu ekspozīcijas laiku;

— apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozēšanas modeli, kas izmantots, pamatojoties uz lietoto *RhE* modeli;

— apraksts par jebkādām testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikācijām.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

— pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem;

— pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;

▼**M8**

— pieņemamā mainība testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

— tabulās apkopoti dati par atsevišķām testējamām ķimikālijām un kontrolēm par katru ekspozīcijas laiku, katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, norādot arī OB vai MTT formazāna smailes laukumu, audu procentuālo dzīvotspēju, audu vidējo procentuālo dzīvotspēju, replikātu atšķirības, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā);

— attiecīgā gadījumā to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsojošām testējamām ķimikālijām, norādot arī OB vai MTT formazāna smailes laukumu, % *NSMTT*, % NSC_{living}, % $_{NSCkilled}$, standartnovirzi un/vai mainības koeficientu (attiecīgā gadījumā) un audu galīgo pareizo procentuālo dzīvotspēju;

— rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolķimikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;

— citu novērotu ietekmju apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozēšanas modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) UN (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Chapter B.4 of this Annex, Acute Dermal Irritation, Corrosion.

(3) Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion.

(4) Chapter B.65 of this Annex, *In Vitro* Membrane Barrier Test Method.

(5) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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., and 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., and 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., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 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. and 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. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (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) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1 000 (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., and 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. and 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) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and 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., and 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 in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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.* In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and 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 and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and 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 CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1 000 (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., and 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. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo rezultātu īpatsvaru (25).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pašā nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums ir lielā mērā atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (25).

ET_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc specifiskas noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC_{50}).

***GHS* (Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kas piedāvā ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasifikāciju pa standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi(1).

HPLC.: augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķimikālijas koncentrācijas, pie kuras audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC_{50}) (sk. arī ET_{50}).

Nefiksēta deva: uz epidermas aplicētas testējamās ķimikālijas daudzums, kas lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu. Maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilā tetrazolija bromīds.

▼**M8**

Daudzkomponentu viela:: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Kontrole *NSC_{killed}*: nespecifiskas krāsas kontrole nonāvētos audos.

Kontrole *NSC_{living}*: nespecifiskas krāsas kontrole dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

PK: pozitīvā kontrole, proti, replikāts, kurā ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārāk liela.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (25).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (25).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību (25).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar šo testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Reakcijām uz kodīgumu parasti ir raksturīgas čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

▼**M8**

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (25).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija:: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼M8

2. papildinājums

ĀDAS KOROZIJAS TESTĒŠANAS VAJADZĪBĀM VALIDĒTO *RHE* TESTĒŠANAS MODEĻU GALVENIE KOMPONENTI

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin™*	*EpiDerm™ SCT*	*SkinEthic™ RHE*	*epiCS®*
Modeļa virsma	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Audu replikātu skaits	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku 2–3	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2	uz ekspozīcijas laiku vismaz 2
Apstrādes devas un aplicēšana	Šķidrumi un viskozas vielas: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Cietas vielas: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl šķīduma (9 g/l) Vaskainas/lipīgas vielas: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) ar neilona tīkliņu	Šķidrumi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu vai bez tā *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* Puscietas vielas: 50 µl (79.4 µl/cm^2) Cietas vielas: 25 µl H_2O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vaski: plakanu "diskveida" gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H_2O.	šķidrumi un viskozas vielas: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* cietas vielas: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) vaskainas/lipīgas vielas: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) ar neilona tīkliņu	šķidrumi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) ar neilona tīkliņu *Testējamās ķimikālijas pirmstestēšanas saderība ar neilona tīkliņu* puscietas vielas: 50 µl (83,3 µl/cm^2) cietas vielas: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (vai attiecīgā gadījumā vairāk) vaskainas vielas: plakanu "diskveida" gabalu (diametrā apm. 8. mm) novieto uz salvetes, kas samitrināta ar 15 µl H_2O.
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas)+ 2 ml MTT 0,3 mg/ml šķīduma uz 180 ± 5 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	40 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 180 ± 15 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, , gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas)+ 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem

▼M8

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	10 µl (šķidruma) vai 10 mg (cietas vielas) + 90 µl H_2O, maisīts 15 min istabas temperatūrā → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	40 µl (šķidruma) vai 20 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O, maisīts 60 min istabas temperatūrā → ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	50 µl (šķidruma) vai 25 mg (cietas vielas) + 300 µl H_2O uz 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 % → ja šķīdums iekrāsojas, jāizdara pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem
Ekspozīcijas laiks un temperatūra	3 min, 60 min (± 5 min) un 240 min (± 10 min) vēdināmā skapī istabas temperatūrā (IT, 18–28°C)	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	3 min istabas temperatūrā un 60 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %
Skalošana	25 ml 1 x fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (2 ml / izsviešana)	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma	20 reižu ar pastāvīgu maigu strūklu 1 x fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma
Negatīvā kontrole	50 µl NaCl šķīduma (9 g/l) testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku	50 µl H_2O testēta ar katru ekspozīcijas laiku
Pozitīvā kontrole	50 µl ledus etiķskābes testēšana tikai 4 stundas	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku	40 µl 8N KOH testēšana tikai 1 stundu	50 µl 8N KOH testēta ar katru ekspozīcijas laiku
MTT šķīdums	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas laiks un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min (± 15 min) 37°C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %	180 min 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2, gaisa relatīvais mitrums 95 %

▼M8

Testēšanas modeļa komponenti	*EpiSkin*™	*EpiDerm*™ *SCT*	*SkinEthic*™ *RHE*	*epiCS*®
Ekstrahēšanas šķīdinātājs	500 µl paskābināta izopropanola (0,04 N HCl izopropanolā) (pilnīgi iegremdēti izolēti audi).	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)	1,5 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)	2 ml izopropanola (ekstrahē no iegremdētā materiāla augšpuses un apakšpuses)
Ekstrahēšanas laiks un temperatūra	istabas temperatūrā pa nakti, aizsargāti no gaismas	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)	bez kratīšanas istabas temperatūrā pa nakti vai ar kratīšanu istabas temperatūrā 120 min (~120 rpm)
Optiskā blīvuma lasījumi	570 nm (545 – 595 nm) bez references filtra	570 nm (vai 540 nm) bez references filtra	570 nm (540 – 600 nm) bez references filtra	540 – 570 nm bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	18 stundas ilga apstrāde ar SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 4,08 stundas ≤ ET_{50} ≤ 8,7 stundas	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 4,0 stundas ≤ ET_{50} ≤ 10,0 stundas	apstrāde ar 1 % *Triton X-100* 2,0 stundas ≤ ET_{50} ≤ 7,0 stundas
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli (NaCl) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,6 and ≤ 1,5 2. Tādiem audu replikātiem, kas 4 stundas eksponēti pozitīvajā kontrolē (ledus etiķskābe), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt ≤ 20 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %.	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 2,8 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt ≤ 15 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % mainības koeficientiem (*CV*) starp audu replikātiem jābūt ≤ 30 %.	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 3,0 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu (un attiecīgā gadījumā 4 stundas) eksponēti pozitīvajā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt < ≤ 15 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %	1. Ar negatīvo kontroli (H_2O) apstrādāto audu replikātu vidējam optiskajam blīvumam attiecībā uz katru ekspozīcijas laiku vajadzētu būt ≥ 0,8 and ≤ 2,8 2. Tādiem audu replikātiem, kas 1 stundu eksponēti pozitīvajāā kontrolē (8N KOH), vidējai dzīvotspējai, kura izteikta procentos no negatīvās kontroles, vajadzētu būt < ≤ 20 % 3. Dzīvotspējas diapazonā 20–100 % un attiecībā uz OB ≥ 0,3, šo divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirība nedrīkstētu pārsniegt 30 %

▼**M8**

3. papildinājums

TESTĒŠANAS MODEĻU VEIKTSPĒJA ATTIECĪBĀ UZ IEDALĪŠANU APAKŠKATEGORIJĀS

Tabulā zemāk norādīta šo četru testēšanas modeļu veiktspēja, kas aprēķināta uz tādu 80 ķimikāliju kopumu, kuras testējuši četri testa izstrādātāji. Aprēķinus izdarījis ESAO sekretariāts un pārskatījusi un par tiem vienojusies ekspertu apakšgrupa (21) (23).

Iedalīšana apakškategorijās ir iespējama ar testēšanas modeļiem *EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE* un *epiCS®* (proti, 1.A apakškategorija attiecībā pret 1.B un 1.C apakškategoriju un attiecībā pret NK).

Šo četru testa modeļu veiktspēja, pārspīlētas klasificēšanas rādītāji, nepietiekami prasīgas klasificēšanas rādītāji un pareizība (prognozētspēja) to 80 ķimikāliju kopumam, kuras attiecībā uz katru testa modeli testētas 2 vai 3 reizes:

STATISTIKA PAR PROGNOZĒM, KAS IEGŪTAS PAR VISU ĶIMIKĀLIJU KOPUMU

(n = 80 ķimikālijas, kas vairāk nekā divās neatkarīgās izpildes reizēs testētas ar *epiCS®* vai trijās neatkarīgās izpildes reizēs attiecībā uz *EpiDerm™ SCT, EpiSkin™* un *SkinEthic™ RhE*, proti, attiecīgi 159 (*) vai 240 klasifikācijas)

	EpiSkin™	*EpiDerm ™*	*SkinEthic™*	*epiCS®*
Pārspīlētas klasificēšanas gadījumi:				
1B un 1.C pārspīlēti klasificēti par 1.A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.B un 1.C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
Nekodīgas vielas pārspīlēti klasificētas par 1.A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Viela pārspīlēti klasificēta par kodīgu vielu.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Vispārējais pārspīlētas klasificēšanas līmenis (visām kategorijām)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Nepietiekami prasīgas klasificēšanas gadījumi:				
1.A nepietiekami prasīgi klasificēta par 1.B un 1.C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1.A nepietiekami prasīgi klasificēta par nekodīgu	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1.B un 1.C nepietiekami klasificētas par nekodīgām	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Vispārējais nepietiekami prasīgas klasificēšanas līmenis (visām kategorijām)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Pareiza klasifikācija:				
Pareizi klasificēta 1.A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Pareizi klasificēta 1.B un 1.C	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Pareizi klasificēta nekodīga viela	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Kopējā pareizība	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NK: nekodīga

(*) sakarā ar nepieejamību viena ķimikālija ar *epiCS®* testēta vienreiz (23)

▼**M8**

4. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO *RHE* AUDIEM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS *HPLC*/*UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Saskaņā ar *FDA* norādījumiem izstrādāts protokols (37) (38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīviem *RhE* audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīviem *RhE* audiem) analīze	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20$ % no laukuma_{LLOQ} (1)
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	$CV \leq 15$ % vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20$ %
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% novirze ≤ 15 % vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20$ %
Matricas ietekme	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	85 % ≤ matricas ietekme % ≤ 115 %
Pārnesums	Izopropanola analīze, ko izdara pēc $ULOQ^2$ standarta analīzes (2)	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20$ % no laukuma_{LLOQ}
Reproducējamība (vienā un tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % novirze ≤ 15 % vai attiecībā uz $LLOQ \leq 20$ % Kvalitātes kontroles: % Novirze ≤ 15 % un $CV \leq 15$ %
Reproducējamība (pa dienām)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte *RhE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% novirze ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte *RhE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% novirze ≤ 15 %

(1) *LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 µg/ml.
(2) *ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.

▼B

B.41. **FOTOTOKSICITĀTES *IN VITRO* 3T3 NRU TESTS**

1. **METODE**

Šī metode ir ekvivalenta ESAO TG 432 (2004) metodei.

1.1. IEVADS

Fototoksicitāte ir organisma toksiska reakcija uz vielu, kas parādās vai pastiprinās (pie zemākām devām) gaismas iedarbībā vai ko izraisa ādas apstarošana pēc sistemātiskas vielas lietošanas.

Fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testu izmanto vielas fototoksicitātes potenciāla noteikšanai, ko izraisa gaismas iedarbībā ierosināts ķīmiskais savienojums. Testā novērtē fotocitotoksicitāti, pamatojoties uz ķīmiskā savienojuma iedarbībai pakļauto šūnu dzīvotspējas relatīvo samazināšanos gaismas klātbūtnē, salīdzinot ar tumsu. Uzskatāms, ka šajā testā identificētās vielas ir fototoksiskas *in vivo* pēc sistemātiskas lietošanas un izkliedēšanas uz ādas vai arī pēc lokālas aplicēšanas uz ādas.

Daudzām ķīmisko vielu klasēm aprakstīta to spēja izraisīt fototoksisku iedarbību (1) (2) (3) (4). Šīm vielām piemīt spēja absorbēt gaismas staru enerģiju redzamās gaismas diapazonā. Saskaņā ar pirmo fotoķīmijas likumu (Grothusa-Drapera [*Grotthaus-Draper*] likums), lai notiktu fotoķīmiska reakcija, ir jāabsorbē noteikts gaismas kvantu daudzums. Tādējādi pirms bioloģiskā testa veikšanas jānosaka testējamās vielas UV un redzamās gaismas absorbcijas spektrs saskaņā ar ESAO TG 101 metodi. Uzskata, ka gadījumos, kad vielas molārās ekstinkcijas/absorbcijas koeficients ir mazāks par 10 $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$, mazvarbūtīgi, ka viela ir fotoreaktīva. Šādai vielai var nebūt nepieciešams veikt fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testu vai kādu citu bioloģisko testu, lai noteiktu tās fotoķīmisko kaitīgumu (1) (5). Skatīt arī 1. papildinājumu.

Fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testa drošuma un piemērotības novērtējums nesen aprakstīts (6) (7) (8) (9). Tika pierādīts, ka fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU tests ļauj prognozēt fototoksicitāti dzīvniekiem un cilvēkiem *in vivo*. Tests nav paredzēts tādas citu veidu kaitīgas iedarbības prognozēšanai, kuru varētu izraisīt ķīmisko vielu un gaismas kopēja iedarbība, piemēram, tas nav attiecināms uz fotogenotoksicitāti, fotoalerģiskumu vai fotokancerogenitāti, kā arī nedod iespējas novērtēt fototoksiskās iedarbības spēku. Bez tam tests nav paredzēts netiešo fototoksicitātes mehānismu, testējamās vielas metabolītu un maisījumu kaitīgās iedarbības pētīšanai.

Metabolizējošu sistēmu izmantošana ir vispārīga prasība visiem *in vitro* testiem genotoksicitātes un kancerogenitātes potenciāla prognozēšanai, tomēr līdz šim fototoksikoloģijā var minēt tikai dažus piemērus, kad vielas metaboliska transformācija ir nepieciešama, lai tā darbotos kā fototoksīns *in vivo* vai *in vitro*. Tādējādi metaboliskās aktivācijas sistēmas izmantošana šim testam netiek uzskatīta par nepieciešamu vai par zinātniski pamatotu.

▼B

1.2. DEFINĪCIJAS

Starojums: uz virsmu krītošas ultravioletās (UV) vai redzamās gaismas intensitāte, ko izsaka W/m^2 vai mW/cm^2.

Gaismas doza: uz virsmas krītošas ultravioletās vai redzamās gaismas starojuma enerģija (= intensitāte × laiks), izsakot džoulos (= W × s) uz laukuma vienību, piemēram, J/m^2 vai J/cm^2.

UV staru viļņu garums: CIE (*Commission Internationale de l ' Eclairage*) ieteiktie diapazonu apzīmējumi ir šādi: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) un UVC (100–280 nm). Var izmantot arī citus diapazonu apzīmējumus; par UVB un UVA robežu parasti pieņem viļņa garumu 320 nm, un UVA var iedalīt UV-A1 un UV-A2, par robežu pieņemot aptuveni pie 340 nm.

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas mēra šūnu populācijas kopējo aktivitāti (piemēram, vitālās krāsvielas *Neutral Red* uzņemšanu šūnu liposomās), kas atkarībā no mērīšanas beigu punkta un testēšanas plāna korelē ar šūnu kopējo skaitu un/vai šūnu dzīvotspēju.

Relatīvā šūnu dzīvotspēja: šūnu dzīvotspēja, kas izteikta attiecībā pret šķīdinātāja (negatīvo) kontroli visā testēšanas laikā (ar apstarošanu vai bez tās), bet neiedarbojoties ar testējamo vielu.

***PIF* (*Photo-Irritation-Factor*) fotokairinājuma koeficients)**: šo koeficientu iegūst, salīdzinot divas citotoksiskas testējamās vielas koncentrācijas (IC_{50}) ar vienādu efektivitāti, apstarojot ar UVA/redzamo gaismu (+Irr) un bez apstarošanas (–Irr).

IC_{50}: testējamās vielas koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās par 50 %.

***MPE* (*Mean-Photo-Effect*) vidējais fotoefekts**: nosakāmā vērtība, ko iegūst koncentrācijas reakcijas līkņu matemātiskā analīzē, salīdzinot līknes, kas iegūtas, apstarojot (+Irr) ar necitotoksisku UVA/redzamo gaismu un bez apstarošanas (–Irr).

Fototoksicitāte: akūta toksiska reakcija, kas rodas, uz ādu iedarbojoties ar konkrētu ķīmisku vielu un pēc tam iedarbojoties ar gaismu, vai arī iedarbība, kura tiek izraisīta līdzīgā veidā, ādu apstarojot pēc sistemātiskas ķīmiskas vielas lietošanas.

1.3. TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU tests pamatojas uz ķīmiskās vielas citotoksicitātes salīdzinājumu, ja testu veic, apstarojot ar mākslīgas dienasgaismas devu, kas nav citotoksiska, un bez apstarošanas. Citotoksicitāti šajā testā izsaka kā vitālās krāsvielas *Neutral Red (NR)* uzsūkšanas samazināšanos 24 stundas pēc iedarbības ar testējamo vielu un apstarošanas, kas ir atkarīga no koncentrācijas (10). *NR* ir vāja katjonu krāsviela, kas nedifundējot viegli penetrē šūnu membrānās, šūnā uzkrājoties lizosomās. Jutīgas lizosomu membrānas šūnu virsmas izmaiņas rezultāts ir lizosomu bojājumi un citas izmaiņas, kas pakāpeniski kļūst neatgriezeniskas. Šo izmaiņu rezultāts, ko izraisa ksenobiotiku iedarbība, ir *NR* uzsūkšanas un saistīšanas samazināšanās. Līdz ar to ir iespējams atšķirt dzīvotspējīgas, bojātas vai nedzīvas šūnas, kas ir šā testa pamatuzdevums.

▼B

Balb/c 3T3 šūnas uztur kultūrā 24 stundas, lai izveidotos monoslāņi. Divas katrai testējamai vielai paredzētas 96 bedrīšu plates vispirms vienu stundu inkubē ar astoņām dažādām testa vielas koncentrācijām. Pēc tam vienu plati apstaro ar lielāko necitotoksisko starojuma devu, bet otru plati tur tumsā. Tad uz abām platēm iedarbības barotni nomaina ar kultivēšanas barotni un pēc 24 stundu inkubācijas nosaka šūnu dzīvotspēju, pamatojoties uz krāsvielas *Neutral Red* uzsūkšanu. Šūnu dzīvotspēju izsaka procentos salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroli bez testējamās vielas, un aprēķina atsevišķi katrai testējamajai koncentrācijai. Lai prognozētu fototoksisko potenciālu, jāsalīdzina koncentrācijas reakcijas ar apstarošanu un bez tās, parasti pie IC_{50} līmeņa, t. i., pie koncentrācijas, kas šūnu dzīvotspēju samazina līdz 50 % salīdzinājumā ar kontroli.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Preparāti**

1.4.1.1. *Šūnas*

Validācijas pētījumiem tika izmantota pastāvīgā peļu fibroblasta šūnu līnija, Balb/c 3T3, klons 31, no *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA*, un no Eiropas Šūnu kultūru kolekcijas *European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK,* un tāpēc ieteicams šūnas ņemt no atzītiem šūnu depozitārijiem. Testēšanai pēc šīs pašas procedūras var izmantot citas kultūras, attiecīgi pielāgojot kultivēšanas apstākļus, tomēr ir jāpierāda ekvivalence.

Šūnas regulāri jāpārbauda, vai tās nav piesārņotas ar mikoplazmu, un tās var izmantot tikai tad, ja šis piesārņojums nav konstatēts (11).

Svarīga ir regulāra šūnu jutības pārbaude pret UV staru iedarbību saskaņā ar kvalitātes kontroles procedūru, kas aprakstīta šajā metodē. Sakarā ar to, ka šūnu UVA jutība var palielināties atkarībā no pārsējumu skaita, jāizmanto Balb/c 373 šūnu kultūras ar iespējami zemāko pārsējumu skaitu, ieteicams mazāku par 100. (Skatīt 1.4.2.2.2. punktu un 2. papildinājumu.)

1.4.1.2. *Barotnes un kultivēšanas apstākļi*

Piemērotas kultūru barotnes un inkubācijas apstākļi jāizmanto šūnu pārsēšanai un testēšanas procedūrai, piemēram, Balb/c 373 šūnām šie apstākļi ir DMEM (pēc Dīlbeko *[Dulbecco]* modificēta Īgla *[Eagle]* barotne), kas papildināta ar 10 % jaundzimuša teļa serumu, 4 mM glutamīnu, penicilīnu (100 IV) un streptomicīnu (100 µg/mL), un inkubācija pie 37 °C mitrā vidē 5–7,5 % CO_2 atkarībā no buferšķīduma (skatīt 1.4.1.4. punkta otro daļu). Īpaši svarīgi, lai šūnu kultūras apstākļi nodrošinātu šūnu cikla ilgumu, kas ir izmantojamās šūnu kultūras vai šūnu līnijas līdzšinējo vēsturisko datu intervālā.

1.4.1.3. *Kultūru sagatavošana*

Šūnas no sasaldētās rezerves kultūras ar atbilstošu blīvumu izsēj kultivēšanas barotnē un pirms izmantošanas fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testam vismaz vienu reizi pārsēj.

▼B

Fototoksicitātes testā izmantojamās šūnas ar atbilstošu blīvumu izsēj kultivēšanas barotnē tā, lai tās nesaplūstu testa beigās, t. i., kad nosaka šūnu dzīvotspēju 48 stundas pēc sēšanas. Ja Balb/c 373 šūnu kultūru audzē 96 bedrīšu platē, ieteicamais šūnu sēšanas blīvums ir 1×10^4 šūnu vienā bedrītē.

Šūnas katrai testējamajai vielai sēj līdzīgā veidā divās atsevišķās 96 bedrīšu platēs, kuras pēc tam izmanto paralēli visā testa procedūras laikā pie identiskiem kultūras apstākļiem, izņemot laiku, kurā vienu plati apstaro (+Irr), bet otru atstāj tumsā (–Irr).

1.4.1.4. *Tesējamās vielas sagatavošana*

Testējamajai vielai jābūt svaigi sagatavotai tieši pirms testēšanas, ja nav datu, kas liecina par stabilitāti glabāšanas laikā. Visu šūnu ķīmisko apstrādi un sākotnējo sagatavošanu ieteicams veikt tādā apgaismojumā, kurā nenotiek testējamās vielas fotoaktivācija vai noārdīšanās vēl pirms apstarošanas.

Testa vielas jāizšķīdina sāļu buferšķīdumā, piemēram, Ērla izotoniskajā sāļu šķīdumā (*Earl ' s Balanced Salt Solution*) vai citā fizioloģiskā buferšķīdumā, kas nesatur olbaltumvielas un gaismu absorbējošas vielas (piemēram, pH indikatora krāsvielas vai vitamīnus), lai novērstu to radītos traucējumus apstarošanas laikā. Sakarā ar to, ka apstarošanas laikā šūnas tiek turētas ārpus CO_2 inkubatora aptuveni 50 minūtes, jānodrošina alkalizācijas novēršana. Ja izmanto vāju buferšķīdumu, piemēram, *EBSS*, to nodrošina, inkubējot šūnas pie 7,5 % CO_2. Ja šūnas tiek inkubētas tikai pie 5 % CO_2, būtu jāizvēlas stiprāks buferšķīdums.

Testējamās vielas ar ierobežotu šķīdību ūdenī jāizšķīdina piemērotā šķīdinātājā. Ja izmanto šķīdinātāju, tam jābūt vienādā daudzumā visās kultūrās, t. i., negatīvajās (šķīdinātāja) kontrolēs, kā arī pie visām testējamās vielas koncentrācijām, un šādā koncentrācijā tas nedrīkst būt citotoksisks. Testējamās vielas koncentrācijas jāizvēlas tā, lai šķīdumos neveidotos nogulsnes vai tie kļūtu nedzidri.

Ieteicamie šķīdinātāji ir dimetilsulfoksīds (DMSO) un etanols (ETOH). Var izmantot arī citus šķīdinātājus, kuriem ir neliela citotoksicitāte. Pirms izmantošanas jānovērtē katra šķīdinātāja īpašības, piemēram, reaģētspēja ar testējamo vielu, tās fototoksiskā efekta samazināšana, radikāļu saistīšanas spēja un/vai ķīmiskā stabilitāte šķīdinātājā.

Testējamās vielas šķīšanas veicināšanai var izmantot maisīšanu ar vorteksu, apstrādi ar ultraskaņu un/vai sildīšanu līdz atbilstošai temperatūrai, ja tādējādi netiek ietekmēta testējamās vielas stabilitāte.

▼B

1.4.1.5. *Apstarošanas apstākļi*

1.4.1.5.1. Gaismas avots

Pareiza gaismas avota un filtru izvēle ir noteicošs fototoksicitātes testa faktors. UVA un redzamās gaismas starojums parasti saistāms ar fototoksiskajām reakcijām *in vivo* (3) (12), turpretī UVM vairāk saistāms ar lielu citotoksicitāti, kas palielinās 1 000 reizes, viļņa garumam samazinoties no 313 līdz 280 nm (13). Piemērota gaismas avota izvēles kritērijos jāiekļauj prasība par to, ka gaismas avotam jāizstaro viļņa garumi, kurus absorbē testējamā viela (absorbcijas spektrs), un gaismas starojuma devai (kas sasniedzama saprātīga ilguma apstarošanas laikā) jābūt pietiekamai zināmo fotocitotoksisko ķīmisko vielu detektēšanai. Bez tam izmantojamie viļņu garumi un devas nedrīkst pārmērīgi kaitēt testēšanas sistēmai, piemēram, emitējot siltumstarojumu (spektra infrasarkanajā reģionā).

Saules gaismas modelēšana ar saules imitatoriem ir uzskatāma par optimālu mākslīgā apgaismojuma avotu. Filtrētā saules imitatora starojuma enerģijas izkliedei jābūt tuvai dabīgās gaismas izkliedei, kas norādīta (14). Saules imitatoros izmanto gan ksenona, gan (ierosināta) dzīvsudraba-metāla halogenīda loka starojumu (15). Ierosināta dzīvsudraba-metāla halogenīda loka starojuma priekšrocība ir tā, kas tas emitē mazāk siltuma un ir lētāks, tomēr atbilstība saules gaismai nav tik precīza ka ksenona lokam. Visi saules gaismas imitatori izstaro ievērojamu UVB daudzumu, tāpēc tie jāaprīko ar filtriem, lai aizturētu ļoti citotoksiskos UVB viļņa garumus. Sakarā ar to, ka šūnu kultūru plastmasas materiāli satur UV stabilizatorus, spektrs jāmēra caur tā paša tipa 96 bedrīšu plates vāku, kāds tiks izmantots eksperimentā. Neskatoties uz pasākumiem, kas veikti, lai aizturētu spektra daļas filtrējot vai uz neizbēgamiem filtra efektiem, ko rada iekārta, spektrs, kas reģistrēts zem šiem filtriem, nedrīkst atšķirties no standartizētās dabīgās dienasgaismas (14). Fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testa validācijas pētījumos izmantotā saules gaismas imitatora filtrētā starojuma spektra sadalījums dots (8) (16). Skatīt arī 1. attēlu 2. papildinājumā.

1.4.1.5.2. Dozimetrija

Gaismas starojuma intensitāte (starojums) jāpārbauda regulāri pirms katra fototoksicitātes testa, izmantojot piemērotu platjoslas UV-metru. Intensitāte jāmēra caur tā paša tipa 96 bedrīšu plates vāku, ko izmanto eksperimentā. UV-spektrometram jābūt kalibrētam pēc avota. UV-metra darbība jāpārbauda ar, ieteicams, tāda paša tipa identiski kalibrētu UV-metru, ko izmanto par etalonu. Ideālā gadījumā lielākos laika intervālos būtu jāizmanto spektroradiometrs gaismas avota filtrētā starojuma spektra mērīšanai un UV-metra kalibrēšanas pārbaudei.

Noskaidrots, ka starojuma doza 5 J/cm^2 (UVA diapazonā) nav citotoksiska Balb/c 373 šūnām, bet ir pietiekama, lai ķīmiskās vielas ierosinātu līdz fototoksisko reakciju izraisīšanas stāvoklim (6) (17), piemēram, lai 50 minūšu laikā sasniegtu 5 J/cm^2, apstarojums tika noregulēts uz 1,7 mW/cm^2. Skatīt 2. attēlu 2. papildinājumā. Ja izmanto citu šūnu līniju vai gaismas avotu, apstarojuma doza būtu, iespējams, jākalibrē tā, lai varētu izvēlēties tādu dozas režīmu, kas šūnām nekaitē, bet ir pietiekama standarta fototoksīnu ierosināšanai. Apstarošanas laiku aprēķina pēc šādas formulas:

▼B

$$t(\min) = \frac{\text{starojuma doza } (J/cm^2) \times 1000}{\text{starojum } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1J = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. **Testēšanas apstākļi**

1.4.2.1. *Testējamās vielas koncentrācijas*

Jānosaka attiecīgie apstarošanai ar gaismu pakļautās (+Irr) un tumsā turētās (–Irr) testējamās vielas koncentrāciju diapazoni, veicot dozu diapazonu noteikšanas eksperimentus. Varētu būt lietderīgi novērtēt sākotnējo šķīdību un pēc 60 minūtēm (vai jebkāda cita iedarbības laika), jo šķīdība var mainīties gan ar laiku, gan apstarošanas iedarbībā. Lai novērstu toksicitāti, kas rodas nepareizu kultivēšanas apstākļu dēļ, vai testējot ļoti skābas vai sārmainas vielas, šūnu kultūrā ar pievienotu testējamo vielu jābūt pH 6,5–7,8.

Lielākajai testējamās vielas koncentrācijai jābūt fizioloģiskajiem testēšanas apstākļiem atbilstošiem, piemēram, tā nedrīkst radīt osmozes vai pH izraisītu stresu. Ņemot vērā testējamās vielas īpašības, kā faktori var būt jāņem vērā arī citas fizikāli ķīmiskās īpašības, kas ierobežo tās koncentrāciju. Relatīvi mazšķīstošām vielām, kuras nav toksiskas koncentrācijās, kas zemākas par piesātināta šķīduma koncentrāciju, testēšana jāveic pie lielākās sasniedzamās koncentrācijas. Vispār, pie koncentrācijām, kādās veic testēšanu, nedrīkst veidoties nogulsnes. Ieteicams, lai testējamās vielas maksimālā koncentrācija nepārsniegtu 1 000 μg/mL, bet osmotiskais spiediens nebūtu lielāks par 10 mmolar. Jāizmanto astoņas testējamās vielas koncentrācijas, kas mainās ģeometriskā progresijā ar pastāvīgu atšķaidījuma koeficientu (skatīt 2.1. punkta otro daļu).

Ja diapazona noteikšanas eksperimentā iegūta informācija, ka testējamā viela nav citotoksiska līdz pat robežkoncentrācijai, veicot eksperimentu tumsā (–Irr), bet ir ļoti citotoksiska apstarojot (+Irr), tad koncentrācijas diapazoni, kuri būtu jāizvēlas (+Irr) eksperimentam, var atšķirties no (–Irr) izvēlētajiem diapazoniem, lai ievērotu prasību par atbilstošas kvalitātes datiem.

1.4.2.2. *Kontroles*

1.4.2.2.1. Šūnu jutība pret radiāciju, iepriekšējo vēsturisko datu iegūšana

Šūnām regulāri (apmēram katram piektajam pārsējumam) jāpārbauda jutība pret gaismas avotu, novērtējot šūnu dzīvotspēju pēc apstarošanas ar pieaugošām starojuma devām. Veicot šo novērtēšanu, jāizmanto vairākas apstarojuma dozas, ieskaitot līmeņus, kas būtiski pārsniedz fototoksicitātes 3T3 NRU testam izmantotos līmeņus. Vienkāršākais šo dozu kvantitatīvās noteikšanas veids ir gaismas avota UV spektra daļu mērījumi. Šūnas tiek izsētas ar blīvumu, kādu izmanto fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testā, un tās nākamajā dienā apstaro. Tad šūnu dzīvotspēju nosaka pēc vienas dienas, pamatojoties uz *Neutral Red* uzsūkšanu. Jāparāda, ka noteiktā lielākā netoksiskā deva (piemēram, validācijas pētījumā 5 J/cm^2 [UVA]) ir pietiekama, lai pareizi klasificētu standartvielas (1. tabula).

▼B

1.4.2.2.2. Jutība pret starojumu, testa pārbaude

Tests atbilst kvalitātes kritērijiem, ja apstarotās negatīvās/šķīdinātāja kontrolēs salīdzinājumā ar neapstarotajiem negatīvajām/šķīdinātāja kontrolēm šūnu dzīvotspēja ir lielāka par 80 %.

1.4.2.2.3. Dzīvotspēja šķīdinātāja kontrolē

No šķīdinātāja kontrolēm ekstrahētās *Neutral Red* absolūtais optiskais blīvums ($D_{540\ NRU}$) parāda, vai vienā bedrītē izsētās 1×10^4 šūnas divās eksperimenta dienās augušas ar parasto dubultošanās laiku. Tests atbilst pieņemamības kritērijiem, ja vidējais neapstrādāto kontroļu $D_{540\ NRU} \geq 0{,}4$ (t. i., aptuveni divdesmit reizes lielāks par šķīdinātāja fona absorbciju).

1.4.2.2.4. Pozitīvā kontrole

Zināma fototoksiskā viela jāpārbauda paralēli katram fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testam. Ieteicams izmantot hlorpromazīnu (HPZ). Pēc standarta noteikumiem testētajam HPZ fototoksicitātes 3T3 NRU testā tika noteikti šādi testa pieņemamības kritēriji: apstarotajam (+Irr) HPZ: IC_{50} = 0,1 līdz 2,0 µg/ml, neapstarotajam HPZ (–Irr): IC_{50} = 7,0 līdz 90,0 µg/mL. Fotokairinājuma koeficientam (*PIF*) jābūt > 6. Jāseko iepriekšējām pozitīvās kontroles izmaiņām pēc datu vēstures.

Citas fototoksiskās vielas, kas atbilst pārbaudāmās vielas ķīmiskajai klasei vai šķīdībai, var izmantot kā paralēlās pozitīvās kontroles hlorpromazīna vietā.

1.4.3. **Testēšanas procedūra (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *1. dienā*

100 µL kultivēšanas barotnes pārnes 96 bedrīšu audu kultūras mikrotitra plates malējās bedrītēs (= tukšie paraugi). Pārējās bedrītēs pārnes pa 100 µL suspensijas $1 \times l0^5$ šūnu/mL šūnu barotnē (= 1×10^4 šūnu/bedrītē). Katrai testējamās vielas koncentrāciju sērijai un šķīdinātāja un pozitīvajām kontrolēm jāsagatavo divas plates.

Šūnas jāiztur inkubatorā 24 stundas (skatīt 1.4.1.2. punktu), kamēr izveidojas daļēji saplūdis monoslānis. Šis inkubācijas laiks nodrošina šūnu atjaunošanos, savienošanos un eksponenciālu augšanu.

1.4.3.2. *2. dienā*

Pabeidzot inkubāciju, kultivēšanas barotni dekantē no šūnām un tās uzmanīgi skalo ar 150 µL buferšķīduma, kas tika izmantots inkubācijai. Pievieno 100 µL buferšķīduma, kas satur atbilstošu testējamās vielas vai šķīdinātāja (šķīdinātāja kontroļu) koncentrāciju. Jābūt astoņām dažādām testējamās vielas koncentrācijām. Šūnas inkubē ar testējamo vielu tumsā 60 minūtes (skatīt 1.4.1.2. punktu un 1.4.1.4. punkta otro daļu).

No divām platēm, kas tika sagatavotas katrai testējamās vielas koncentrāciju sērijai un kontrolēm, jāizvēlas, parasti pēc nejaušības principa, viena plate citotoksicitātes noteikšanai (–Irr) (t. i., kontroles plate) un viena (apstrādājamā plate) – fotocitotoksicitātes noteikšanai (+Irr).

▼B

Veicot +Irr apstarošanu, šūnas apstaro pie istabas temperatūras 50 minūtes caur 96 bedrīšu plates vāku ar lielāko no starojuma dozām, kas nav citotoksiska (skatīt arī 2. papildinājumu). Neapstarotā plate (–Irr) jāiztur istabas temperatūrā tumšā kamerā 50 minūtes (= apstarošanas ar gaismu laiks).

Testējamo šķīdumu dekantē un uzmanīgi divas reizes skalo ar 150 µL buferšķīduma, kas tika izmantots inkubācijai, bet nesatur testējamo materiālu. Buferšķīdumu aizstāj ar kultivēšanas barotni un inkubē (skatīt 1.4.1.2. punktu) līdz nākamajai dienai (18–22 stundas).

1.4.3.3. *3. dienā*

1.4.3.3.1. Apskate ar mikroskopu

Jānosaka šūnu augšana, morfoloģija un monoslāņa integritāte ar fāzu kontrastmikroskopu. Reģistrē šūnu morfoloģijas izmaiņas un ietekmi uz šūnu augšanu.

1.4.3.3.2. Neutral Red uzsūkšanas tests

Šūnas jānoskalo ar 150 µL iepriekš sasildīta buferšķīduma. Skalojamais šķīdums jāatdala, uzmanīgi nolejot. Pievieno 100 µL *Neutral Red* (*NR*) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazīna hidrohlorīda, *Einecs* Nr. 209-035-8; *CAS* Nr. 553-24-2; C.I. 50040), kura koncentrācija ir 50 µg/mL barotnē bez seruma (16), un trīs stundas inkubē, kā aprakstīts 1.4.1.2. punktā.

Pēc inkubācijas atdala barotni ar *NR* un šūnas noskalo ar 150 µL buferšķīduma. Lieko buferšķīdumu dekantē un atdala ar iesūcināšanu vai centrifugēšanu.

Desorbētajai *NR* pievieno precīzi 150 µL svaigi pagatavota šķīduma ar šādu sastāvu: 49 daļas ūdens + 50 daļas etanola + 1 daļa etiķskābes.

Mikrotitra plati uzmanīgi krata (mikrotitra plašu kratītājā) 10 minūtes, kamēr *NR* tiek ekstrahēts no šūnām un izveidojas viendabīgs šķīdums.

Mēra *NR* ekstrakta optisko blīvumu pie 540 nm spektrofotometrā, kā etalonu izmantojot tukšo paraugu. Dati jāglabā atbilstošā formāta failā turpmākai analīzei.

2. **DATI**

2.1. DATU KVALITĀTE UN APJOMS

Testēšanas datiem jānodrošina apstarotās un neapstarotās koncentrācijas atbildes reakcijas ticamas analīzes iespējas un, ja iespējams, arī tās testa vielas koncentrācijas analīze, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās līdz 50 % (IC_{50}). Ja konstatēta citotoksicitāte, jānosaka gan koncentrācijas diapazons, gan atsevišķo koncentrāciju līkņu krustošanās ar ordinātu asi tā, lai varētu konstruēt līkni pēc eksperimenta datiem.

Ja rezultāti ir skaidri pozitīvi vai skaidri negatīvi (skatīt 2.3. punkta pirmo daļu), tad varētu pietikt ar sākotnējo eksperimentu, ko papildina ar vienu vai vairākiem orientējošiem dozu diapazona noteikšanas izmēģinājumiem.

▼B

Neviennozīmīgi, robežai tuvi vai neskaidri rezultāti jāprecizē, veicot papildu eksperimentus (skatīt 2.4. punkta otro daļu). Šādos gadījumos jāizskata eksperimenta apstākļu modificēšanas iespēja. Eksperimenta apstākļi, kurus varētu modificēt, ir koncentrāciju diapazons vai intervāls koncentrāciju starpā, iepriekšējās inkubācijas un apstarošanas laiks. Apstarošanas laiku var saīsināt, testējot ūdens šķīdumā nestabilas vielas.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA

Lai varētu novērtēt datus, jāaprēķina fotokairinājuma koeficients (*PIF*) vai vidējais fotoefekts (*MPE*).

Fotocitotoksicitāti aprēķina (skatīt turpmāk), atsevišķās koncentrācijas un atbildes reakcijas vērtības aproksimējot ar nepārtrauktu koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarības līkni (modeli). Līknes izlīdzināšanu pēc iegūtajiem datiem parasti veic ar nelineārās regresijas metodi (18). Lai novērtētu datu mainīguma ietekmi uz izlīdzināto līkni, ieteicams izmantot paškorelācijas *(bootstrap)* metodi.

Fotokairinājuma koeficientu (*PIF*) aprēķina pēc šādas formulas:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Ja IC_{50} gaismas klātbūtnē vai tumsā nav iespējams aprēķināt, tad nevar noteikt testējamā materiāla *PIF*.

Vidējais fotoefekts (*MPE*) pamatojas uz koncentrācijas atbildes līkņu pilnu salīdzinājumu (19). To nosaka kā reprezentatīvā fotoefekta vērtību kopas vidējo svērto lielumu:

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoefektu PE_c pie jebkuras koncentrācijas C nosaka kā atbildes efekta RE_c un dozas efekta DE_c reizinājumu, t. i., $PE_c = RE_c \times DE_c$. Atbildes efekts RE_c ir gaismā un tumsā novērojamo atbildes reakciju starpība, t. i., $RE_c = R_c$ (–Irr) – R_c (+Irr). Dozas efektu aprēķina pēc formulas:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kur C* ir ekvivalences koncentrācija, t. i., koncentrācija, pie kuras +Irr atbildes reakcija ir vienāda ar –Irr atbildes reakciju pie koncentrācijas C. Ja C* nevar noteikt, jo +Irr līknes atbildes vērtības ir sistemātiski augstākas vai zemākas par RC (–Irr), tad dozas efektu pieņem par 1. Iesvara koeficientus w_i dod lielākā atbildes reakcijas vērtība, t. i., w_i = MAX {Ri (+Irr), Ri (–Irr)}. Koncentrācijas tīklu C_i izvēlas tādu, lai to pašu punktu skaitu iekļautu katrā koncentrāciju intervālā, kas noteikts ar eksperimentā izmantotajām koncentrācijām. *MPE* aprēķina tikai maksimālās koncentrācijas vērtībai, pie kuras vismaz viena no divām līknēm joprojām parāda atbildes reakcijas vērtību vismaz 10 %. Ja šī maksimālā koncentrācija pārsniedz lielāko no koncentrācijām, kas tika izmantotas +Irr eksperimentā, tad pārējai +Irr līknes daļai pieņem atbildes reakcijas vērtību "0". Atkarībā no tā, vai MPE vērtība pārsniedz izraudzīto sliekšņa vērtību (MPE_c = 0,15), viela tiek vai netiek klasificēta kā fototoksiska.

▼B

Pieejama programmatūra *PIF* un *MPE* aprēķināšanai (20).

2.3. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Pamatojoties uz validācijas pētījumu (8), ja testējamās vielas PIF < 2 vai MPE < 0, tad var pieņemt, ka: "fototoksicitātes nav". Ja 2 < PIF < 5 vai 0,1 < MPE < 0,15, tad prognozē: "fototoksicitāte iespējama", un, ja PIF > 5 vai MPE > 0,15, tad prognozē: "fototoksicitāte ir".

Katrai laboratorijai, kas pirmo reizi ievieš šo testēšanas metodi, pirms nezināmu vielu testēšanas to fototoksicitātes noteikšanai jāanalizē 1. tabulā minētās standartvielas. Noteiktajām *PIF* vai *MPE* vērtībām jābūt tuvām 1. tabulā minētajām vērtībām.

1. tabula

Ķīmiskais nosaukums	*Einecs* Nr.	*CAS* Nr.	*PIF*	*MPE*	Absorbcijas maksimums	Šķīdinātājs [1]
Amiodarona hidrohlorīds	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (plecs)	etanols
Hlorpromazīna hidrohlorīds	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanols
Norfloksacīns	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitrils
Antracēns	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitrils
Dinātrija protoporfirīns IX	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanols
L-histidīns		[7006-35-1]	no PIF	0,05–0,10	211 nm	ūdens
Heksahlorofēns	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (plecs)	etanols
Nātrija laurilsulfāts	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	adsorbcijas nav	ūdens

[1] Absorbcijas mērīšanai izmantotais šķīdinātājs.

2.4. DATU INTERPRETĀCIJA

Ja fototoksisku iedarbību novēro tikai augstākajām testējamās vielas koncentrācijām (īpaši ūdenī šķīstošajām vielām), var rasties nepieciešamība pēc papildu apsvērumiem, novērtējot risku. Šie apsvērumi var iekļaut sevī datus par absorbciju un ķīmisko vielu uzkrāšanos ādā un/vai citos testos iegūtus datus, piemēram, ķīmisko vielu testēšanā ar dzīvnieku vai cilvēka ādu vai ādas modeļiem *in vitro* iegūtos rezultātus.

▼B

Ja toksicitāte netika konstatēta (+Irr un –Irr) un ja zemas šķīdības dēļ ir testējamo koncentrāciju ierobežojumi, testēšanas rezultāti var būt apšaubāmi un papildus jāveic apstiprinošs tests, piemēram, izmantojot citu modeli.

3. **PĀRSKATS**

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj vismaz šāda informācija.

Testējamā viela:

— identifikācijas dati, nosaukumi un *IUPAC* un *CAS* numurs, ja zināms,

— fizikālās īpašības un tīrības pakāpe,

— fizikāli ķīmiskās īpašības, kas attiecas uz testēšanu,

— UV/redzamās gaismas absorbcijas spektrs,

— stabilitāte un fotostabilitāte, ja zināma.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izvēles pamatojums,

— testējamās vielas šķīdība šķīdinātājā,

— šķīdinātāja saturs procentos iedarbības barotnē.

Šūnas:

— šūnu tips un avots,

— norāde, ka nav mikoplazmas,

— šūnu pārsējumu skaits, ja zināms,

— šūnu jutība pret apstarojumu, kas noteikta ar fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testam izmantoto iekārtu.

Testēšanas apstākļi (1); *inkubācija pirms un pēc apstrādes*:

— kultivēšanas barotnes tips un sastāvs,

— inkubācijas apstākļi (CO_2 koncentrācija; temperatūra; mitrums),

— inkubācijas ilgums (pirms apstrādes; pēc apstrādes).

Testēšanas apstākļi (2); *apstrāde ar testējamo vielu*:

— testēšanai izmantojamo vielas koncentrāciju izvēles pamatojums testam ar apstarošanu un bez tās,

— testējamās vielas ierobežotas šķīdības gadījumā un ja nav konstatēta citotoksicitāte: augstākās testējamās koncentrācijas izvēles pamatojums,

— apstrādei izmantotās barotnes tips un sastāvs (sāļu buferšķīdums),

— ķīmiskās iedarbības ilgums.

Testēšanas apstākļi (3); *apstarojums*:

— izmantotā gaismas avota izvēles pamatojums,

▼B

— gaismas avota un radiometra ražotājs un tips,

— gaismas avota starojuma spektra raksturlielumi,

— izmantoto filtru caurlaidības un absorbcijas raksturlielumi,

— radiometra raksturlielumi un kalibrēšanas dati,

— gaismas avota attālums no testējamās sistēmas,

— UVA starojums šajā attālumā, izsakot mW/cm^2,

— apstarošanas ilgums ar UV/redzamo gaismu,

— UVA doza (starojums × laiks), izsakot J/cm^2,

— šūnu kultūru temperatūra apstarošanas laikā un paralēlo šūnu kultūru temperatūra, kuras iztur tumsā.

Testēšanas apstākļi (4); šūnu dzīvotspējas tests ar *Neutral Red*:

— iedarbībai ar *Neutral Red* paredzētās barotnes sastāvs,

— *Neutral Red* inkubācijas ilgums,

— inkubācijas apstākļi (CO_2 koncentrācija; temperatūra; mitrums),

— *Neutral Red* ekstrakcijas apstākļi (ekstrahents; ilgums),

— viļņa garums, pie kura spektrofotometriski nosaka *Neutral Red* optisko blīvumu,

— otrs (references) viļņa garums, ja izmanto,

— spektrofotometriskā tukšā parauga sastāvs, ja izmanto.

Rezultāti:

— šūnu vidējā dzīvotspēja visās testējamās vielas koncentrācijās, procentos no dzīvotspējas paralēlajās šķīdinātāja kontrolēs,

— koncentrācijas un atbildes reakcijas līknes (testējamās vielas koncentrācijas šūnu relatīvās dzīvotspējas sakarība), kas iegūtas paralēlajos +Irr un –Irr eksperimentos,

— koncentrācijas un atbildes reakcijas līkņu analīze: ja iespējams, IC_{50} (+Irr) un IC_{50} (-Irr) datoraprēķins/aprēķins,

— divu koncentrācijas un atbildes reakcijas līkņu salīdzinājums, kas iegūtas apstarojot un neapstarojot, – aprēķinot fotokairinājuma koeficientu (PIF) vai aprēķinot vidējo fotoefektu (MPE),

— testa pieņemamības kritēriji; paralēlā šķīdinātāja kontrole,

— apstaroto un neapstaroto šūnu absolūtā dzīvotspēja (*Neutral Red* ekstrakta optiskais blīvums),

— vēsturiskie dati par negatīvajām un šķīdinātāja kontrolēm; vidējās vērtības un standartnovirzes,

— testa pieņemamības kritēriji; paralēlā pozitīvā kontrole,

▼B

— pozitīvās kontroles vielas IC_{50} (+Irr) un IC_{50} (–Irr) un PIF/MPE,

— vēsturiskie dati par pozitīvās kontroles vielu: IC_{50} (+Irr) un IC_{50} (–Irr) un PIF/MPE; vidējās vērtības un standartnovirzes.

Rezultātu novērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology In Vitro 7: p. 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, p. 314–348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitisation. 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/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicology In Vitro 8, p. 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, p. 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 EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology In Vitro 12, p. 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, p. 119–124.

(11) Hay, R.J. (1988). The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 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, p. 1825–1829.

(14) ISO 1097 (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, p. 679–708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127–138.

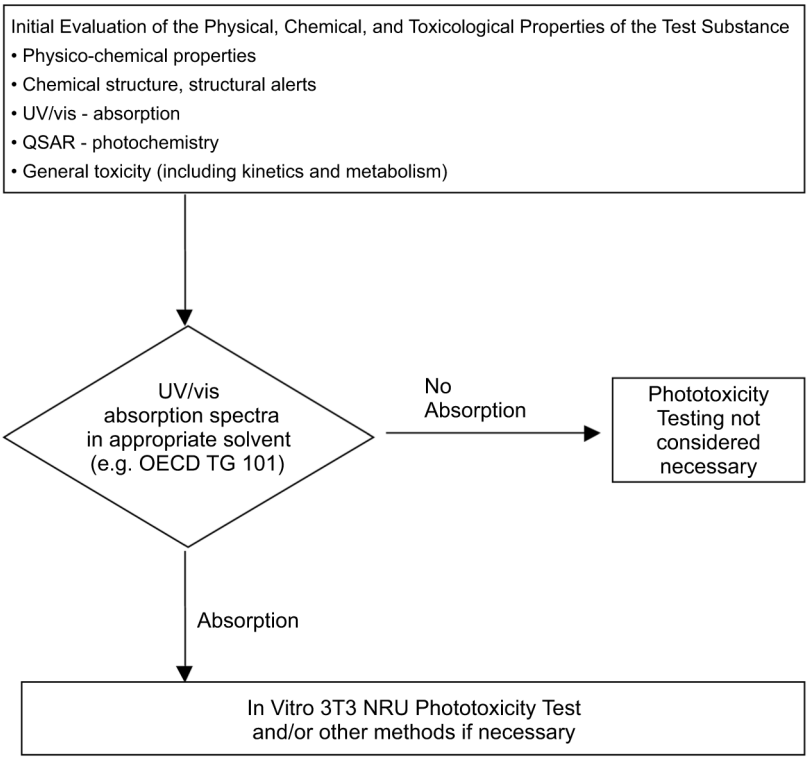
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445–462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html.

▼B

1. papildinājums

Fototoksicitātes *in vitro* 3T3 NRU testa izmantošana saskaņā ar ķīmisko vielu fototoksicitātes pakāpeniskas testēšanas pieeju

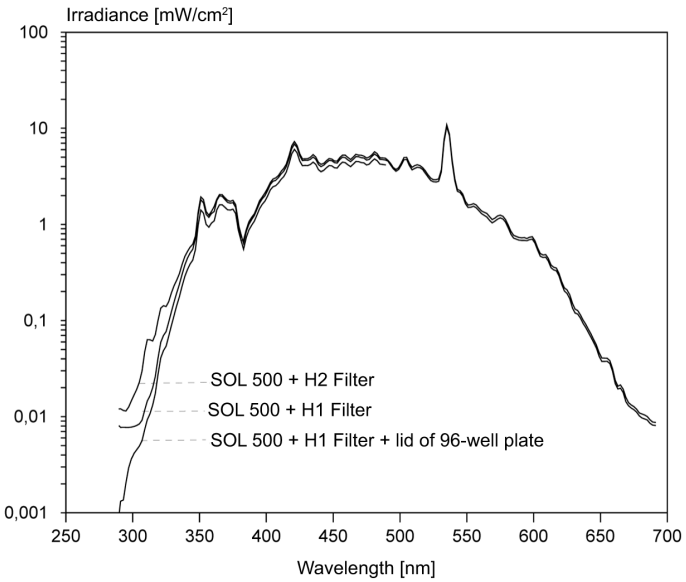


▼B

2. papildinājums

1. attēls

Saules gaismas imitatora filtrēta starojuma spektrālās jaudas sadalījums



(skatīt 1.4.1.5. punkta otro daļu)

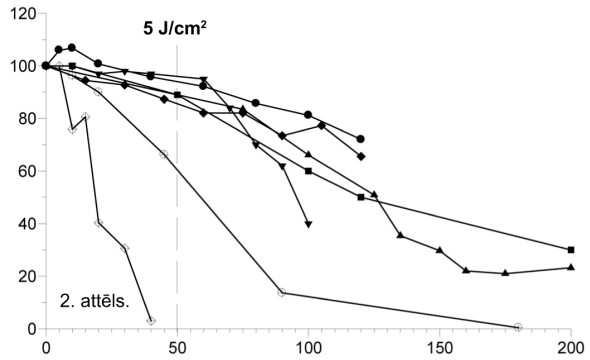
1. attēlā parādīts filtrētā saules imitatora pieņemamās spektrālās jaudas sadalījums. Tas noteikts aktivēta metāla halogenīda avotam, kas tika izmantots fototoksicitātes 3T3 NRU testa validēšanas izmēģinājumos (6) (8) (17). Attēlā parādīti divu dažādu filtru un 96 bedrīšu kultivācijas plates vāka papildu filtrēšanas efekti. H2 filtrs tika izmantots tikai testēšanas sistēmām, kas spēj izturēt lielāku UVB daudzumu (ādas modeļa tests un sarkano asinsķermenīšu fotohemolīzes tests). Fototoksicitātes 3T3 NRU testā tika izmantots H1 filtrs. Attēlā parādītais plates vāka papildu filtrēšanas efekts novērojams galvenokārt UVB diapazonā un atstāj tādu UVB daudzumu starojuma spektrā, kas ir pietiekams, lai ierosinātu ķīmiskās vielas, kurām piemīt absorbcija UVB diapazonā, piemēram, amiodarons (skatīt 1. tabulu).

▼B

2. attēls

Balb/c 3T3 šūnu jutība pret apstarošanu (UVA diapazonā)

Šūnu dzīvotspēja (*Neutral Red* uzsūkšana aptumšotajās kontrolēs, %)



(skatīt 1.4.1.5.2. punkta otro daļu; 1.4.2.2.1., 1.4.2.2.2. punktu)

Balb/c 3T3 šūnu jutība pret fototoksicitātes 3T3 NRU testa validācijas izmēģinājumā izmantotā saules imitatora starojumu, mērot UVA diapazonā. Attēlā parādīti validēšanas priekšizpētes rezultāti no septiņām dažādām laboratorijām (1). Divas līknes ar gaišiem punktiem tika iegūtas ar vecām šūnu kultūrām (liels pārsējumu skaits), kuras bija jānomaina ar jaunām, bet līknes ar tumšiem punktiem parāda šūnas ar pieņemamu jutību pret starojumu.

Pēc šiem datiem tika noteikta lielākā necitotoksiskā starojuma doza: 5 J/cm^2 (vertikālā punktētā līnija). Horizontālā punktētā līnija parāda arī maksimālo pieņemamo apstarojuma efektu, kas minēts 1.4.2.2. punktā.

▼M3

B.42. **ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (*LLNA*)**

IEVADS

1. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas un uz tām pamatotās ES testēšanas metodes tiek regulāri pārskatītas, ņemot vērā tehnikas attīstību, regulatīvo prasību izmaiņas un dzīvnieku labturības apsvērumus. Sākotnējā, jau apstiprinātā testēšanas metode (TM) ādas sensibilizācijas noteikšanai pelēm ir lokālo limfmezglu noteikšanas metode (*LLNA*; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas; šā pielikuma B.42. nodaļa) (1). Ir publicēti *LLNA* validācijas un ar to saistītā darba pārskati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Atjauninātās *LLNA* pamatā ir praktiskās pieredzes un zinātnisko datu izvērtējums (12). Šī ir otrā no divām TM, kas izstrādājamas, lai novērtētu ķīmiskām vielām vai to maisījumiem piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu (dzīvniekiem). Pirmajā TM (ESAO 406. testēšanas vadlīnijas; šā pielikuma B.6. nodaļa) izmanto testēšanu ar jūrascūciņām, proti, maksimizācijas testu jūrascūciņām un Bīlera testu (13). Salīdzinot ar B.6 un EASO 406. testēšanas vadlīnijām (13), *LLNA* ir pārāka dzīvnieku labturības ziņā. Šī atjaunināta *LLNA* TM ietver veiktspējas standartus (*PS*) (1. papildinājums), kurus var izmantot, lai novērtētu tādu jaunu un/vai pārveidotu testēšanas metožu validācijas statusu, kuras ir funkcionalitātes vai noteikšanas mehānisma ziņā līdzīgas *LLNA*, saskaņā ar ESAO Vadlīniju dokumentā Nr. 34 izklāstītajiem principiem (14).

2. *LLNA* pēta ādas sensibilizācijas indukcijas fāzi un sniedz kvantitatīvus datus, kas piemēroti atbildes reakcijas uz devu novērtēšanai. Turklāt jānorāda, ka vieglas/vidējas iedarbības sensibilizatori, kas ir ieteikti kā piemērotas pozitīvās kontroles vielas (*PC*) jūrascūciņu testa metodēm (B.6; EASO 406. testēšanas vadlīnijas) (13), ir piemēroti arī lietošanai ar *LLNA* (6) (8) (15). Kā viena no iespējamām pieejām šajā TM aprakstīta reducētā *LLNA* (*rLLNA*), kura ļauj maksimāli par 40 % samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu (16) (17) (18). *rLLNA* var izmantot, ja ir regulatīva vajadzība apstiprināt negatīvu ādas sensibilizācijas potenciāla prognozi un ar nosacījumu, ka tiek ievērotas visas pārējās šajā TM aprakstītās *LLNA* protokola specifikācijas. Negatīvai ādas sensibilizācijas potenciāla prognozei būtu jābalstās uz visu pieejamo informāciju, kā aprakstīts 4. punktā. Lai varētu piemērot *rLLNA* pieeju, vajadzīgs skaidrs pamatojums un zinātniski argumenti. Ja pretēji gaidītajam ar *rLLNA* tiek iegūts pozitīvs vai neskaidrs rezultāts, var būt jāturpina testēšana, lai interpretētu vai precizētu minēto rezultātu. *rLLNA* nebūtu izmantojama ādu sensibilizējošu testējamo vielu bīstamības noteikšanai gadījumos, kad jānovērtē reakcija uz devu, piemēram, nosakot apakškategorijas atbilstīgi Regulai (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ANO Globāli harmonizētajai ķīmisko vielu klasifikācijas un marķēšanas sistēmai.

DEFINĪCIJAS

3. Definīcijas skatīt 2. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *LLNA* ir viena no alternatīvām, kuras var izmantot ķīmisko vielu – potenciālu ādas sensibilizatoru noteikšanā. Tas nenozīmē, ka visos gadījumos *LLNA* būtu jālieto jūrascūciņu testa vietā (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13), bet gan to, ka šī noteikšana ir minētajam testam līdzvērtīga un to var izmantot kā alternatīvu, kuras pozitīvajam vai negatīvajam rezultātam vairs nav vajadzīgs papildu apstiprinājums. Pirms uzsākt pētījumus, testēšanas laboratorijai jāņem vērā visa par testējamo vielu pieejamā informācija. Pie šādas informācijas pieder tās identifikācija un ķīmiskā struktūra, fizikāli

▼M3

ķīmiskās īpašības, citu *in vitro* vai *in vivo* veikto toksicitātes testu rezultāti un toksikoloģiskie dati par struktūras ziņā saistītām vielām. Šī informācija jāizvērtē, lai noteiktu *LLNA* piemērotību konkrētajai vielai (ņemot vērā atsevišķu veidu vielu nesaderību ar *LLNA*; skatīt 5. punktu) un lai izraudzītos pareizu testējamās vielas devu.

5. *LLNA* ir *in vivo* metode un kā tāda paredz dzīvnieku izmantošanu alerģiskās kontakta sensibilizējošās aktivitātes novērtējumā. Tomēr šim mērķim vajadzīgo dzīvnieku skaits var būt mazāks nekā parasti. Turklāt *LLNA* piedāvā būtiski uzlabot veidu, kādā dzīvnieki tiek izmantoti alerģiskās kontakta sensibilizācijas testēšanā (mazāk sāpju un ciešanu). *LLNA* pamatojas uz to imunoloģisko gadījumu izskatīšanu, kurus ķīmiskās vielas stimulē sensibilizācijas indukcijas fāzē. Atšķirībā no testiem ar jūrascūciņām (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13) ar *LLNA* nav jānoskaidro provocētās–inducētās ādas hipersensibilizācijas reakcijas. Turklāt *LLNA* nav jāizmanto palīgviela, kā tas ir jūrascūciņu maksimizācijas testā (13). Tādā veidā *LLNA* mazina dzīvnieku sāpes un ciešanas. Neraugoties uz *LLNA* priekšrocībām salīdzinājumā ar B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijām, ir jāatzīst, ka ir daži ierobežojumi, kas var radīt nepieciešamību izmantot B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijas (13) (piemēram, ar *LLNA* noteikti šķietami negatīvi dažiem metāliem, šķietami pozitīvi dažiem ādas kairinātājiem [tādiem kā atsevišķas surfaktantu tipa ķīmiskās vielas] (19) (20), vai testējamās vielas šķīdība). Turklāt vajadzība pēc jūrascūciņu testiem (B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (21) var saglabāties attiecībā uz ķīmisko vielu klasēm vai vielām, kuru sastāvā ir funkcionālās grupas, par kurām ir pierādīts, ka tās darbojas kā potenciāli sajaucējfaktori (13). Bez tam, pamatojoties uz ierobežoto validācijas datubāzi, kas sastāvēja pārsvarā no pesticīdu preparātiem, attiecībā uz šāda tipa testējamām vielām (22) drīzāk *LLNA*, nevis jūrascūciņu tests dos pozitīvu rezultātu. Tomēr, testējot preparātus, varētu līdztekus testēt arī salīdzināšanas vielas (līdzīgas vielas, kuru reakcija ir zināma), lai pierādītu, ka *LLNA* darbojas pienācīgi (skatīt 16. punktu). Izņemot šādus minētos ierobežojumus, *LLNA* jāvar izmantot jebkuras vielas testēšanai, ja vien testējamai vielai nav tādu īpašību, kas varētu ietekmēt *LLNA* precizitāti.

METODES PRINCIPS

6. *LLNA* pamatprincips ir tāds, ka sensibilizatori inducē limfocītu savairošanos limfmezglos, kuri drenē testējamās vielas saņemšanas vietu. Šī savairošanās ir proporcionāla devai un alergēna iedarbīgumam un ir vienkāršs paņēmiens, lai iegūtu kvantitatīvu sensitivitātes mērījumu. Savairošanās pakāpi nosaka, vidējo savairošanos katrā testējamās vielas grupā salīdzinot ar vidējo savairošanos kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju (VC). Nosaka attiecību starp vidējo progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju VC grupā; tas ir stimulācijas indekss (SI). Lai testējamo vielu pamatoti klasificētu kā potenciālu ādas sensibilizatoru, SI vērtībai jābūt $\geq$ 3. Šeit aprakstīto procedūru pamatā ir *in vivo* veikta radioaktīvā iezīmēšana šūnu savairošanās izmērīšanai aurikulārajos limfmezglos. Tomēr šūnu savairošanās vērtēšanai var izmantot citus beigu punktus ar nosacījumu, ka pilnībā tiek ievēroti *PS* (1. papildinājums).

▼M3

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

7. Šim testam izvēlētā suga ir peles. Izmanto jaunas, pieaugušas CBA/Ca vai CBA/J līnijas sievišķā dzimuma peles, kas nav dzemdējušas un nav grūsnas. Pētījuma sākumā dzīvniekiem jābūt 8–12 nedēļu veciem, dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un ne lielākām par 20 % no vidējās masas. Citas līnijas un vīrišķā dzimuma dzīvniekus var izmantot, ja ir iegūts pietiekami daudz datu, lai parādītu, ka *LLNA* atbildes reakcijā nav nozīmīgu atšķirību, kas specifiskas līnijai un/vai dzimumam.

Turēšanas un barošanas apstākļi

8. Ja nav zinātniska pamatojuma, kāpēc peles būtu turamas katra atsevišķi, peles izmitina grupā (23). Telpā, kurā tur izmēģinājumu dzīvniekus, jābūt 22 ± 3 °C temperatūrai. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50-60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam atbilstoši secībai 12 stundas gaišas, 12 stundas tumšas. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens daudzumu.

Dzīvnieku sagatavošana

9. Dzīvniekus izvēlas pēc nejaušības principa, marķē individuālai identificēšanai (bet nekādā veidā nemarķē ausis) un tur būros vismaz piecas dienas pirms testa sākuma, lai tos aklimatizētu laboratorijas apstākļos. Pirms apstrādes uzsākšanas visus dzīvniekus apskata, lai pārliecinātos, ka tiem nav novērojami ādas bojājumi.

Testa šķīdumu sagatavošana

10. Cietas ķīmiskās vielas pirms peļu ausu apstrādes izšķīdina vai suspendē, izmantojot šķīdinātājus vai nesējus, un vajadzības gadījumā atšķaida. Šķidras ķīmiskās vielas var izmantot gan atšķaidītas, gan neatšķaidītas. Nešķīstošas ķīmiskās vielas (kādas parasti izmanto medicīnas iekārtās) pirms peļu ausu apstrādes ekstrahē piemērotā šķīdinātājā, lai visas ekstrahējamās sastāvdaļas būtu pieejamas testēšanai. Ja dati par testējamo vielu stabilitāti liecina, ka tās uzglabāt nevar, katru dienu sagatavo svaigas testējamās vielas.

Ticamības pārbaude

11. Metodes veiktspējas pienācīgumu parāda ar pozitīvās kontroles vielu (PC) palīdzību, kas ar adekvātu un reproducējamu sensibilitāti reaģē kā sensibilizējošas testēšanas vielas, kuru reakcijas intensitāte ir sīki aprakstīta. Ieteicams paredzēt vienlaicīgu PC, jo tādā veidā var pierādīt laboratorijas spēju atkārtoti un sekmīgi īstenot noteikšanu, kā arī novērtēt iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību un rezultātu salīdzināmību. Pirms *LLNA* ieteicams lietotājiem konsultēties ar atbildīgajām iestādēm, jo dažas regulatīvās iestādes pieprasa PC izmantošanu katrā individuālā pētījumā. Attiecīgi labāk ir ikreiz izmantot vienlaicīgu PC, jo tas ļauj neveikt papildu testēšanu ar dzīvniekiem, lai izpildītu prasības, kuras var izrietēt no PC periodiskas izmantošanas (skatīt 12. punktu). PC jādod pozitīva *LLNA* atbildes reakcija tādā iedarbības līmenī, kurā ir sagaidāms stimulācijas indekss (SI) > 3, salīdzinot ar negatīvās kontroles vielu (NC) grupu. PC deva jāizvēlas tā, lai neizraisītu pārmērīgu ādas kairinājumu vai sistēmisku toksicitāti un lai indukcija būtu atkārtojama, taču ne pārmērīga (tā ir pārmērīga, piemēram, ja

▼**M3**

SI > 20). Ieteicamākās PC ir 25 % heksilkanēļskābes aldehīds (*CAS* Nr. 101-86-0) ar acetonu/olīveļļu (4:1 tilp./tilp.) un 5 % merkaptobenzotiazols (*CAS* No. 149-30-4) ar *N,N*-dimetilformamīdu (skatīt 1 papildinājuma 1. tabulu). Var būt apstākļi, kad ar pienācīgu pamatojumu var izmantot citas PC, kas atbilst iepriekš minētajiem kritērijiem.

12. Lai gan vienlaicīgas PC grupas izmantošana ir ieteicama, var būt situācijas, kad laboratorijās, kurās *LLNA* veic regulāri (t. i., vismaz reizi mēnesī) un kurās tāpēc ir vēsturiska PC datubāze, kas pierāda laboratorijas spēju ar PC iegūt reproducējamus un pareizus rezultātus, adekvātāka var izrādīties periodiska PC izmantošana (t. i., vismaz reizi 6 mēnešos). *LLNA* metodes adekvātu pārzināšanu var sekmīgi pierādīt, ar PC iegūstot konsekventus pozitīvus rezultātus vismaz 10 neatkarīgās testēšanas reizēs, kuras veiktas samērīgā laika periodā (t. i., ne ilgāk kā gada laikā).

13. Vienlaicīga PC grupa noteikti jāiekļauj, kad *LLNA* notiek procedurālas izmaiņas (piemēram, augsti kvalificēta personāla nomaiņa, testēšanas metodes materiālu un/vai reaģentu nomaiņa, cits izmēģinājumu dzīvnieku piegādātājs), un šādas izmaiņas pienācīgi jādokumentē laboratorijas pārskatos. Jānovērtē šādu izmaiņu ietekme uz iepriekš izveidotās vēsturiskās datubāzes adekvātumu un tas, vai vajag veidot jaunu vēsturisku datubāzi, lai dokumentētu ar PC iegūtu rezultātu konsekvenci.

14. Pētniekiem jāapzinās, ka lēmums par periodisku, nevis vienlaicīgu PC izmantošanu ietekmēs to, kādā mērā par adekvātiem un pieņemamiem varēs uzskatīt negatīvos pētījumu rezultātus, kas bez vienlaicīgas PC iegūti periodiskās PC izmantošanas starplaikos. Piemēram, ja ar periodisko PC pētījumu iegūst šķietami negatīvu rezultātu, var apšaubīt negatīvu testējamās vielas rezultātu, kas iegūts iepriekšējā pieņemamā periodiskā PC pētījuma un nepieņemamā periodiskā PC pētījuma starplaikā. Tāpēc rūpīgi jāizvērtē, vai izmantot vienlaicīgu vai periodisku PC. Tāpat jāizvērtē, kādas ir iespējas vienlaicīgās PC grupā izmantot mazāk dzīvnieku, ja to var zinātniski pamatot un ja laboratorija ar saviem specifiskajiem vēsturiskajiem datiem var pierādīt, ka ir iespējams izmantot mazāk peļu (12).

15. Kaut arī PC jātestē nesējā, par kuru ir zināms, ka tas izrāda viendabīgu atbildes reakciju (piemēram, acetons/olīveļļa; 4:1 tilp./tilp.), var būt dažas reglamentējošas situācijas, kurās būs nepieciešama arī testēšana nestandarta nesējā (klīniski/ķīmiski piederīgs sastāvs) (24). Ja vienlaicīgo PC testē ar citu nesēju nekā testējamo vielu, vienlaicīgās PC vajadzībām jāparedz atsevišķs VC.

16. Ja vērtē testējamās vielas, kas pieder konkrētai ķīmisko vielu klasei vai kas dod noteikta diapazona reakciju, var izmantot salīdzināšanas vielas, kuras noder, lai parādītu, ka testēšanas metode darbojas un pienācīgi nosaka šā tipa testējamām vielām piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu. Pienācīgām salīdzināšanas vielām ir jāpiemīt šādām īpašībām:

— strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām;

— labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības;

— papildinoši dati no *LLNA*;

— papildinoši dati saistībā ar citiem dzīvniekiem un/vai cilvēku.

▼M3

TESTA PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un devu līmeņi

17. Uz devas grupu ar vismaz trim testējamās vielas koncentrācijām izmanto vismaz četrus dzīvniekus un vienlaicīgas NC grupu, kas saņem tikai testējamās vielas nesēju, un PC grupu (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu). Jāapsver iespēja testēt vairākas PC devas, īpaši tad, ja PC testēšana ir periodiska. Izņemot apstrādi ar testējamo vielu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

18. Devu un nesēja izvēlei jāpamatojas uz atsaucē (3) un (5) sniegtajiem ieteikumiem. Secīgas devas parasti izraugās no atbilstošas koncentrāciju rindas, kā 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, u. c. Koncentrāciju rindas izvēlei jābūt ar adekvātu zinātnisku pamatojumu. Jāizvērtē visa esošā toksikoloģiskā (piemēram, akūta toksicitāte un dermālais kairinājums) un struktūras un fizikālķīmiskā informācija par attiecīgo testējamo vielu (un/vai par struktūras ziņā saistītām vielām), ja tāda ir, un trīs secīgās koncentrācijas jāizraugās tā, lai augstākā no tām izraisītu stiprāko iedarbību, kura vēl nerada sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (3) (25). Ja šādas informācijas nav, sākumā var būt jāveic priekšskrīninga tests (skatīt 21.–24. punktu).

19. Nesējs nedrīkst pārmainīt vai maskēt testēšanas rezultātus, un tas jāizraugās tāds, lai šķīdība būtu iespējami lielāka, tā ļaujot iegūt augstāko reāli sasniedzamo koncentrāciju un iegūstot šķīdumu/suspensiju, kas būtu derīga testējamās vielas pielietošanai. Ieteicamie nesēji ir acetons/olīveļļa (4:1 tilp./tilp.), *N,N*-dimetilformamīds, metiletilketons, propilēnglikols un dimetilsulfoksīds (19), bet var izmantot arī citus, ja tam ir pietiekams zinātniskais pamatojums. Dažos gadījumos papildu kontrolei jāizmanto klīniski atbilstošs šķīdinātājs vai tirdzniecības preparāts, kura sastāvā testējamo vielu tirgo. Īpaši jārūpējas, lai nodrošinātu to, ka hidrofīlas testējamās vielas ir iekļautas nesēja sistēmā, kas mitrina ādu un tūlīt nenotek, un jāizmanto pienācīgi šķīdinātāji (piemēram, 1 % Pluronic® L92). Tādēļ ir jāizvairās no nesējiem, kas satur vienīgi ūdeni.

20. Izpētot no individuālām pelēm iegūtus limfmezglus, var novērtēt dzīvnieku savstarpējās atšķirības un iegūt testējamās vielas grupas un VC grupas mērījumu statistisku salīdzinājumu (skatīt 35. punktu). Turklāt PC grupas peļu skaita iespējamā samazinājuma izvērtējumam jēga ir tad, ja dati ir par individuāliem dzīvniekiem (12). Dažas regulatīvās iestādes prasa, lai dati būtu par individuāliem dzīvniekiem. Citas turpretim par pieņemamiem var uzskatīt arī datus par apstrādes dzīvnieku grupām, un šādā situācijā lietotājiem ir izvēle starp individuālu un grupas datu vākšanu.

Priekšskrīninga tests

21. Ja nav informācijas, lai noteiktu augstāko testējamo devu (skatīt 18. punktu), jāveic priekšskrīninga tests, lai definētu ar *LLNA* testējamo atbilstošo devas līmeni. Priekšskrīninga testa mērķis ir būt par orientieri ar *LLNA* testējamā maksimālā devas līmeņa izvēlē, ja nav informācijas par koncentrāciju, kādā testējamā viela izraisa sistēmisku toksicitāti (skatīt 24. punktu) un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (skatīt 23. punktu). Maksimālajam testējamās vielas devas līmenim vajadzētu būt 100 % (šķidrumiem) un augstākajai iespējamajai koncentrācijai (cietām vielām un suspensijām).

▼M3

22. Priekšskrīninga testa apstākļi ir identiski pamata *LLNA* apstākļiem, izņemot to, ka nevērtē progresiju limfmezglos un ka devas grupā var izmantot mazāku skaitu dzīvnieku. Ieteicamais skaits ir viens vai divi dzīvnieki katrā devas grupā. Visām pelēm ik dienas pārbauda to, vai apstrādes vietā nav klīnisku pazīmju, kas liecinātu par sistēmisku toksicitāti vai lokālu kairinājumu. Pirms testa un tā beigās (6. diena) reģistrē dzīvnieku ķermeņa masu. Katrai peles apskata abas ausis, un iespējamo apsārtumu novērtē pēc 1. tabulas punktu skalas (25). Auss biezumu mēra ar piemērotu mērierīci (piemēram, digitālo mikrometru vai "Peacock" tipa biezuma mērierīci) 1. dienā (pirms devas), 3. dienā (aptuveni 48 stundas pēc pirmās devas) un 6. dienā. Turklāt 6. dienā auss biezumu var mērīt ar auss caursišanas paņēmienu pēc tam, kad dzīvnieki ir humāni nonāvēti. Lokālu ādas kairinājumu uzskata par pārmērīgu tad, ja jebkurā mērījumu dienā apsārtuma novērtējums pēc punktu skalas ir $\geq$ 3 un/vai auss biezums ir palielinājies par $\geq$ 25 % (26) (27). Lielākā deva, kas izmantojama *LLNA* pamata testā, ir otrā zemākā deva priekšskrīninga koncentrāciju rindā (skatīt 18. punktu), kas neizraisa sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu.

1. tabula

Apsārtuma (eritēmas) skala

Pazīmes	Punktu skaits
Apsārtuma nav	0
Vāji izteikts (gandrīz nemanāms) apsārtums	1
Izteikts apsārtums	2
Vidēji stiprs un ļoti stiprs apsārtums	3
Ļoti stiprs apsārtums (biešu sarkans) un kreveles, kas apsārtuma novērtēšanu padara neiespējamu	4

23. Papildus auss biezuma 25 % pieaugumam (26) (27) kairinātāju identificēšanai *LLNA* izmanto arī statistiski nozīmīgus auss biezuma pieauguma rādītājus apstrādātajām pelēm salīdzinājumā ar kontroles grupas pelēm (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tomēr, lai gan statistiski nozīmīgs pieaugums var arī nesasniegt 25 % robežu, šādu pieaugumu neuzskata par pārmērīga kairinājuma izpausmi (30) (32) (33) (34).

24. Turpmāk uzskaitītie klīniskie novērojumi, ja tie ir novērtējuma neatņemama daļa, var liecināt par sistēmisku toksicitāti (35) (36), un tāpēc var parādīt, kāds būs *LLNA* pamata testā izmantojamais maksimālais devas līmenis: nervu sistēmas darbības traucējumi (piemēram, piloarekcija, ataksija, drebuļi un krampji); uzvedības traucējumi (piemēram, agresivitāte, ar personīgo higiēnu saistītās uzvedības maiņa, jūtams aktivitātes samazinājums vai pieaugums); nerakstura elpošana (piemēram, elpas vilcienu biežuma un intensitātes maiņa, kā apgrūtināta vai spazmatiska elpošana, trokšņi plaušās) un pārmaiņas barības un ūdens uzņemšanā. Turklāt novērtējumā jāņem vērā letarģijas pazīmes un/vai reakcijas samazināšanās un visas klīniskās pazīmes, kas liecina par vairāk nekā mirklīgām sāpēm un ciešanām, vai ķermeņa masas samazinājums par vairāk nekā 5 % laikā no 1. dienas līdz 6. dienai, kā arī mirstības rādītāji. Mirstoši dzīvnieki vai dzīvnieki, kuriem acīmredzami sāp vai kuri smagi un ilgstoši cieš, ir humāni jānonāvē (37).

▼M3

Eksperimenta grafiks pamata pētījuma laikā

25. Eksperimenta grafiks ir šāds:

— *1. diena:* Individuāli nosaka un reģistrē katra dzīvnieka masu, izdara un reģistrē klīniskos novērojumus. Katras auss aizmugures virsmu apstrādā ar 25 µl atšķaidījuma, kurš satur attiecīgo testējamo vielu, tikai nesēju vai PC (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu).

— *2. un 3. diena:* Atkārto 1. dienā veikto apstrādi.

— *4. un 5. diena:* Apstrāde nenotiek.

— *6. diena:* Reģistrē katra dzīvnieka masu. Visām testa un kontroles pelēm astes vēnā injicē 250 µl sterila fosfāta bufera fizioloģiskā šķīduma (PBS), kas satur 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritiāta (^{3}H)-metiltimidīna. Alternatīvi visām pelēm astes vēnā injicē 250 µl sterila PBS, kas satur 2 µCi (7.4×10^4 Bq) ^{125}I–joddeoksiuridīna un 10^{-5}M fluordeoksiuridīna. Pēc piecām stundām (5 h) visus dzīvniekus humāni nonāvē. Pelēm izgriež aurikulāros limfmezglus un ievieto PBS katram dzīvniekam atsevišķi (individuālo dzīvnieku pieeja); alternatīvi izgriež visus aurikulāros limfmezglus un ievieto PBS katrai eksperimenta grupai kopā (apstrādes grupas pieeja). Sīkus datus un diagrammas par limfmezglu identificēšanu un izgriešanu skatīt atsaucēs (12). Eksperimenta protokolā var iekļaut papildu parametrus, kas raksturo turpmāku ādas lokālo reakciju pamata pētījuma laikā, piemēram, auss apsārtuma novērtējumu pēc punktu skalas vai auss biezuma mērījumus (nosaka ar mērierīci vai ar auss caurumošanas paņēmienu autopsijā).

Šūnu suspensiju sagatavošana

26. No abās pusēs izgrieztām limfmezglu šūnām (*LNC*) iegūtu atsevišķu šūnu suspensiju no atsevišķiem dzīvniekiem vai no apstrādes grupas pagatavo, šūnas saudzīgi mehāniski sadalot caur nerūsējošā tērauda sietu ar 200 µm acu izmēru vai izmantojot citu paņēmienu, kas ir derīgs atsevišķu šūnu suspensiju ieguvei. *LNC* divreiz mazgā lielā daudzumā PBS, un DNS izgulsnē ar 5 % trihloretiķskābi (TCA) 4 °C temperatūrā 18 stundu laikā (3). Plāksnītes vai nu vēlreiz suspendē 1 ml TCA un pārnes scintilācijas stobriņos, kas satur 10 ml ^{3}H skaitīšanas scintilācijas šķidruma, vai tieši pārnes gamma skaitīšanas caurulītēs ^{125}I skaitīšanai.

Šūnu savairošanās noteikšana (inkorporētā radioaktivitāte)

27. ^{3}H-metiltimidīna inkorporēšanos mēra ar β-scintilāciju skaitīšanu kā sadalīšanās skaitu minūtē (DPM). ^{125}I-joddeoksiuridīna inkorporēšanos mēra ar ^{125}I skaitīšanu un arī izsaka kā DPM. Atkarībā no izmantotās pieejas inkorporēšanos izsaka kā DPM katrai pelei (individuālā pieeja) vai DPM apstrādes grupai (apstrādes grupas pieeja).

Reducētā LLNA

28. Atsevišķos gadījumos, ja ir regulatīva vajadzība apstiprināt negatīvu ādas sensibilizācijas potenciāla prognozi un ar nosacījumu, ka tiek ievērotas visas pārējās šajā TM aprakstītās *LLNA* protokola specifikācijas, var izmantot fakultatīvu, *rLLNA* protokolu (16) (17) (18), kuram vajadzīgs mazāk izmēģinājuma dzīvnieku. Lai varētu piemērot *rLLNA* pieeju, vajadzīgs skaidrs pamatojums un zinātniski argumenti. Ja iegūtais rezultāts ir pozitīvs vai neskaidrs, var būt jāturpina testēšana, lai interpretētu vai precizētu minēto rezultātu.

▼M3

29. Devas grupu skaita samazinājums ir vienīgā atšķirība starp *LLNA* un *rLLNA* testēšanas metožu protokoliem, un tāpēc ar *rLLNA* neiegūst datus par devas un atbildes reakcijas mijiedarbību. Tātad *rLLNA* neizmanto gadījumos, kad minētā informācija ir vajadzīga. Tāpat kā daudzdevu *LLNA* gadījumā, testējamās vielas koncentrācijai, kuru vērtē ar *rLLNA*, jābūt augstākajai koncentrācijai, kura vēl nerada acīmredzamu sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu pelēm (skatīt 18. punktu).

NOVĒROJUMI

Klīniskie novērojumi

30. Ikviena pele vismaz reizi dienā ir rūpīgi jānovēro attiecībā uz vietēju kairinājumu apstrādes vietā vai sistēmiskas toksicitātes klīniskajām pazīmēm. Visus novērojumus sistemātiski reģistrē, par katru peli izdarot individuālu ierakstu. Novērošanas plānā jāiekļauj kritēriji, kas ļauj tūlīt identificēt peles, kurām ir sistēmiskas toksicitātes, pārmērīga lokāla ādas kairinājuma vai ādas korozijas pazīmes, lai tām veiktu eitanāziju (37).

Ķermeņa masa

31. Kā norādīts 25. punktā, individuālu dzīvnieku ķermeņa masa ir jānosaka testa sākumā un pirms plānotās humānās nonāvēšanas.

REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

32. Katras apstrādes grupas rezultātu izsaka ar SI. Ja izmanto individuālo pieeju, SI iegūst, DPM vidējo lielumu katrai pelei katrā testējamās vielas grupā un PC grupā dalot ar DPM vidējo lielumu katrai pelei šķīdinātāja/VC grupā. Tā VC grupās vidējais SI ir 1. Ja izmanto apstrādes grupas pieeju, SI iegūst, dalot katras apstrādes grupas apvienoto radioaktīvo inkorporāciju ar apvienotās VC grupas inkorporāciju; rezultāts ir vidējais SI.

33. Lēmumu pieņemšanas procesā rezultātu uzskata par pozitīvu, ja SI $\geq$ 3. Tomēr, nosakot, vai neitrālam tuvu rezultātu varētu uzskatīt par pozitīvu, var ņemt vērā arī devas un atbildes reakcijas stiprumu un šķīdinātāja/nesēja un PC reakcijas statistisko nozīmīgumu un konsekvenci (4) (5) (6).

34. Ja nepieciešams paskaidrot iegūtos rezultātus, jāņem vērā testējamās vielas dažādās īpašības, tostarp tas, vai tā strukturāli līdzinās jau zināmiem ādas sensibilizatoriem, vai tā izraisa pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu pelēm un kāda veida atbildes reakcija uz devu ir novērota. Šie un citi apsvērumi sīkāk iztirzāti citur (7).

35. Radioaktivitātes datu vākšana par individuālām pelēm pavērs iespējas statistiskai analīzei par devas un atbildes reakcijas mijiedarbības esību un tās pakāpi šajos datos. Jebkurš statistisks novērtējums var ietvert devas un atbildes reakcijas mijiedarbības novērtējumu, kā arī pienācīgi koriģētus testējamo grupu salīdzinājumus (piemēram, devu pāri grupā un šīs grupas salīdzinājums ar vienlaicīgu VC grupu). Statistiskā analīze var ietvert, piemēram, lineāro regresiju jeb Viljama [*William's*] testu, ar ko analizē devas un atbildes reakcijas mijiedarbību tendences, un Daneta [*Dunnett*] testu, lai salīdzinātu devu pārus. Izvēloties attiecīgu statistiskās analīzes metodi, pētniekam jāapzinās iespējamās mainīgo lielumu nevienādības un citas ar to saistītās problēmas, kuru dēļ var būt nepieciešama datu pārveidošana vai neparametriskā statistiskā analīze. Visādā ziņā iespējams, ka pētniekam SI būs jāaprēķina un statistiskā analīze jāveic gan ar, gan bez dažiem punktveida datiem (respektīvi, neņemot vērā galējības jeb rupjas kļūdas).

▼M3

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Dati

36. Dati jāapkopo tabulā. Individuālu dzīvnieku apstrādes gadījumā jānorāda indivīdu DPM vērtības, grupas vidējā DPM vērtība uz dzīvnieku, attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) un vidējais SI katrai devas grupai salīdzinājumā ar kontroles VC grupu. Dzīvnieku grupas apstrādes gadījumā jānorāda vidējais DPM un vidējais SI katrai devas grupai salīdzinājumā ar kontroles VC grupu.

Testēšanas pārskats

37. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai:

Testējamā viela un kontroles vielas:

— identifikācijas dati (piemēram, *CAS* un EK numurs (ja ir); avots; tīrība; zināmie piemaisījumi; partijas numurs),

— fizikālās un fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, gaistamība, stabilitāte, šķīdība),

— maisījuma gadījumā: sastāvs un sastāvdaļu relatīvais procentuālais daudzums.

Šķīdinātājs/nesējs:

— identifikācijas dati (tīrība; koncentrācija (attiecīgā gadījumā); izmantotais tilpums),

— nesēja izvēles pamatojums.

Izmēģinājumu dzīvnieki:

— CBA peļu avots,

— dzīvnieku mikrobioloģiskais statuss, ja tas zināms,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— dzīvnieku avots, turēšanas un barošanas apstākļi utt.

Testēšanas apstākļi:

— sīkas ziņas par testējamās vielas sagatavošanu un pielietošanu,

— devu izvēles pamatojums, attiecīgā gadījumā iekļaujot priekšskrīninga testa rezultātus,

— izmantotās nesēja un testējamās vielas koncentrācijas un pielietotās testējamās vielas kopējais daudzums,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (iekļaujot barības veidu/izcelsmi, ūdens izcelsmi),

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem testa rezultātu klasificē kā pozitīvu vai negatīvu,

— sīkas ziņas par novirzēm no protokola un paskaidrojums par to, kādā veidā šī novirze ietekmē pētījuma plānu un rezultātus.

Ticamības pārbaude:

— jaunākās ticamības pārbaudes rezultātu kopsavilkums, iekļaujot informāciju par testējamo vielu, tās koncentrāciju un nesēju,

— vienlaicīgas un/vai vēsturiskas PC un vienlaicīgas NC dati no testēšanas laboratorijas,

▼M3

— ja vienlaicīga PC nav paredzēta: datums un laboratorijas pārskats par nesenāko kārtējo PC un pārskats par agrāko PC datiem konkrētajā laboratorijā, kuri pamato vienlaicīgas PC neveikšanu.

Rezultāti:

— individuālu peļu masa dozēšanas sākumā un veicot plānoto nonāvēšanu; vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) katrai apstrādes grupai,

— toksicitātes parādīšanās gaita un pazīmes, iekļaujot ādas kairinājumu ievadīšanas vietā, ja tāds ir, katram dzīvniekam,

— tabulā apkopoti dati par individuālu peļu (individuālu dzīvnieku pieeja) vai vidējām (apstrādes grupu pieeja) DPM vērtībām un SI vērtībām katrai apstrādes grupai,

— vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) par DPM katrai pelei katrā apstrādes grupā un galējību jeb rupju kļūdu analīze katrā apstrādes grupā, ja izmanto individuālu dzīvnieku pieeju,

— aprēķinātais SI un attiecīgs mainības mērs, kas ņem vērā to, ka ne testējamās vielas grupā, ne kontroles grupā dzīvnieki nav identiski (ja izmanto individuālu dzīvnieku pieeju),

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— attiecīgā gadījumā, statistiskā analīze.

Rezultātu izvērtējums:

— īss komentārs par rezultātiem, atbildes reakcijas uz devu analīzi un, attiecīgā gadījumā, statistisko analīzi ar secinājumu, vai testējamā viela jāuzskata par ādas sensibilizatoru.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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, Available at: [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. Available at: 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. Available at: [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. Available at: [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, Available at: 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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1. papildinājums

Veiktspējas standarti, pēc kuriem vērtējamas ierosinātās līdzīgās vai modificētās metodes ādas sensibilizācijas testēšanai ar *LLNA*

IEVADS

1. Veiktspējas standartu (*PS*) izstrādes mērķis ir izveidot pamatu, kuram pielīdzināt jaunas testēšanas metodes – gan aizsargātas (t. i., ar autortiesībām, tirdzniecības zīmēm, reģistrāciju), gan neaizsargātas –, lai noteiktu, vai konkrētajām testēšanas vajadzībām tās ir pietiekami pareizas un ticamas. Šos *PS*, kuru pamatā ir validētas un pieņemtas testēšanas metodes, var izmantot, lai izvērtētu, cik ticamas un pareizas ir citas, līdzīgas metodes (ikdienā dēvētas par *me-too* jeb atdarinājuma testiem), kuru pamatā ir līdzīgi zinātniski principi un ar kurām mēra vai prognozē tā paša veida bioloģisko vai toksisko iedarbību (14).

2. Pirms pieņemt modificētas metodes (t. i., ierosinātos potenciālos uzlabojumus jau apstiprinātā testēšanas metodē), jāveic novērtējums, kurā jānosaka ierosināto izmaiņu ietekme uz testa veiktspēju un pakāpe, kādā šīs izmaiņas ietekmē informāciju, kas pieejama par citiem validēšanas procesa komponentiem. Atkarībā no ierosināto izmaiņu daudzuma un rakstura, datiem, ko tās ģenerē, un papildu dokumentācijas šīs metodes vai nu jāvalidē tādā procesā, kāds paredzēts jaunām testēšanas metodēm, vai (ja tas ir pamatoti) ierobežotā apjomā, izmantojot esošos *PS*, jānovērtē to ticamība un piemērotība (14).

3. Izmantojot ķīmiskās vielas, kas aptver visu ādas reakcijas klasifikācijas *LLNA* skalu, jānosaka ticamība un precizitāte visām līdzīgajām vai modificētajām metodēm, kuras izmanto saskaņā ar šo TM. Lai novērstu dzīvnieku neattaisnotu izmantošanu, modeļu izstrādātājiem, pirms uzsākt validācijas pētījumus saskaņā ar šajā TM sniegtajiem *PS* un testēšanas vadlīnijām, stingri ieteicams konsultēties ar attiecīgajām iestādēm.

4. Attiecībā uz līdzīgu vai modificētu *LLNA* versiju validitātes novērtēšanu šo *PS* pamatā ir ASV *US-ICCVAM*, Eiropas *EC-ECVAM* un Japānas *JaCVAM* harmonizētie *PS* (12). *PS* veidojošie elementi ir būtiskie testēšanas metodes komponenti, ieteicamās references vielas un pareizības un ticamības standarti, kas ierosinātajai metodei jāsasniedz vai jāpārsniedz.

I. **Testēšanas metodes būtiskie komponenti**

5. Lai nodrošinātu to, ka *LLNA* līdzīgā vai modificētā metode funkcionalitātes ziņā vai pēc noteikšanas mehānisma ir analoga *LLNA* un mēra to pašu bioloģisko iedarbību, testēšanas metodes protokolā jāiekļauj šādi komponenti:

— testējamā ķīmiskā viela topikāli jāaplicē uz abām peles ausīm,

— limfocītu savairošanās jāmēra limfmezglos, kuri drenē testējamās ķīmiskās vielas aplicēšanas vietu,

— limfocītu savairošanās jāmēra ādas sensibilizācijas indukcijas fāzē,

▼M3

— testējamām vielām: lielākajai izraudzītajai devai jāatbilst augstākajai koncentrācijai, kura vēl nerada acīmredzamu sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu pelēm; pozitīvām references vielām: lielākajai devai jābūt vismaz tikpat lielai kā *LLNA* EC3 vērtībām atbilstošajām references vielām (skatīt 1. tabulu), vēl neradot sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu pelēm,

— katrā pētījumā jāparedz kontroles VC grupa un, attiecīgā gadījumā, arī vienlaicīga PC grupa,

— jāizmanto vismaz četri dzīvnieki katrā devas grupā,

— drīkst vākt datus tiklab par individuāliem dzīvniekiem kā par dzīvnieku grupām.

Ja minētie kritēriji nav pilnībā izpildīti, šos *PS* nevar izmantot līdzīgas vai modificētas metodes validēšanai.

II. **References vielu obligātais minimums**

6. ASV *US-ICCVAM*, Eiropas *EC-ECVAM* un Japānas *JaCVAM* harmonizētajos *PS* (12) identificētas 18 obligāti izmantojamas references vielas un 4 fakultatīvas references vielas (t. i., vielas, kas *LLNA* uzrāda šķietami pozitīvu vai šķietami negatīvu rezultātu salīdzinājumā ar cilvēka un jūrascūciņu materiāla testēšanas rezultātiem (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13) un tāpēc dod iespēju demonstrēt *LLNA* līdzvērtīgu vai par to labāku veiktspēju), un tās visas ir iekļautas *LLNA PS*. Minēto ķīmisko vielu identificēšanai izmantotie atlases kritēriji ir šādi:

— sarakstā iekļautās references vielas pārstāv tādu veidu vielas, kurām parasti testē ādas sensibilizācijas potenciālu, un reakciju diapazonu, ko ir iespējams izmērīt vai prognozēt ar *LLNA*,

— tās ir ar precīzi noteiktu ķīmisko struktūru,

— par katru no šīm vielām ir pieejami *LLNA* dati no jūrascūciņu testa (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13) un, attiecīgā gadījumā, cilvēka materiāla testēšanas rezultāti,

— vielas ir brīvi pieejamas no komerciāliem avotiem.

Ieteicamās references vielas uzskaitītas 1. tabulā. Pētījumi, kuros izmantotas ieteiktās references vielas, jāvērtē, izmantojot tām atbilstošo 1. tabulā norādīto nesēju. Ja tabulā norādīta viela nav pieejama, ar pienācīgu pamatojumu drīkst izmantot citas vielas, kas atbilst iepriekš minētajiem atlases kritērijiem.

▼M3

1. tabula

LLNA PS ieteicamās references vielas

Nr.	Ķīmiskā viela (1)	CAS Nr.	Veids	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Faktiskais EC3 diapazons	LLNA vs. jūrasc.	LLNA vs. cilv.
1	5-hlor-2-metil-4-izotiazolīn-3-ons (CMI)/2-metil-4-izotiazolīn-3-ons (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-fenilēndiamīns	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobalta hlorīds	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeigenols	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenztiazols	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citrāls	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	Eigenols	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenilbenzoāts	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Kanēļskābes spirts	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Urīnvielas imidazolidinils	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metilmetakrilāts	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Hlorbenzols	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Izopropanols	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Nr.	Ķīmiskā viela ([1])	CAS Nr.	Veids	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Faktiskais EC3 diapazons	LLNA vs. jūrasc.	LLNA vs. cilv.
16	Pienskābe	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metilsalicilāts	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Salicilskābe	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Vielas, kuru lietojums par *LLNA* labākas veiktspējas demonstrēšanai ir fakultatīvs										
19	Nātrija laurilsulfāts	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Ksilols	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Niķeļa hlorīds	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Saīsinājumi: AOO = acetons/olīveļļa (4:1, tilp./tilp.); *CAS* Nr. = Ķīmiskā informatīvā dienesta [*Chemical Abstracts Service*] numurs; DMF = *N,N*-dimetilformamīds; DMSO = dimetilsulfoksīds; DNCB = 2,4-dinitrohlorbenzols; EC3 = koncentrācija, kurā stimulācijas indeksa vērtība ir 3; GP = jūrascūciņu testa rezultāts (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13); HCA = heksilkanēļskābes aldehīds; Liq = šķidrums; LLNA = peļu lokālo limfmezglu noteikšanas rezultāts (B.42; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas) (1); MEK = metiletilketons; NA = nepiemēro, jo stimulācijas indekss < 3; NC = nav aprēķināts, jo dati pieejami tikai no viena pētījuma; Sol = cieta viela; Veh = nesējs.

(*) Tiek uzskatīta par cilvēka ādu nesensibilizējošu vielu, jo: nav zināmi klīniski ādas strēmelīšu testa rezultāti; viela nav ādas strēmelīšu testa komplektā iekļauts alergēns; nav zināmi cilvēka ādas sensibilizācijas gadījumi.

(**) GP dati nav pieejami.

([1]) Ja dati par testējamo vielu stabilitāti liecina, ka tās uzglabāt nevar, katru dienu sagatavo svaigas testējamās ķīmiskās vielas.

([2]) Dažādi nesēji var dažādi ietekmēt *LLNA* veiktspēju, tāpēc ar katru references vielu jālieto tai ieteicamais nesējs (24)(32).

([3]) Ja pieejama vairāk nekā viena EC3 vērtība, norādīta vidējā vērtība. Vielām ar negatīvu reakciju (t. i., stimulācijas indekss < 3) norādīta augstākā testētā koncentrācija.

([4]) *LLNA* pētījumu skaits, no kuriem iegūti dati.

([5]) Komerciāli pieejams ar nosaukumu katons CG (*CAS* Nr. 55965-84-9); CMI un MI maisījums attiecībā 3:1. Katra komponenta relatīvā koncentrācija ir no 1,1 % līdz 1,25 % (CMI) un no 0,3 % līdz 0,45 % (MI). Neaktīvie komponenti ir magnija sāļi (21,5 % līdz 24 %) un vara nitrāts (0,15 % līdz 0,17 %), atlikusī preparāta daļa ir 74 % līdz 77 % ūdens. Katons CG ir brīvi pieejams no tādiem komerciāliem avotiem kā *Sigma-Aldrich* un *Rohm and Haas* (tagad *Dow Chemical Corporation*).

▼M3

III. **Definētie ticamības un pareizības standarti**

7. Vērtējot ar 18 obligāti izmantojamajām references vielām, līdzīgas vai modificētas *LLNA* metodes pareizībai jābūt tādai pašai, kā paredz *LLNA PS*, vai lielākai. Jaunajai vai modificētajai metodei jānodrošina pareiza klasifikācija "jā/nē" līmenī. Tomēr ar jauno vai modificēto metodi var neizdoties pareizi klasificēt visas obligāti izmantojamās references vielas. Ja, piemēram, nepareizi klasificēts kāds no vājajiem sensibilizatoriem, bet tiek sniegts nepareizās klasifikācijas izskaidrojums un attiecīgi papildu dati (piemēram, testēšanas rezultāti, kuros pareizi klasificētas citas vielas, kam piemītošās fizikālās, ķīmiskās un sensibilizējošās īpašības ir līdzīgas nepareizi klasificētās references vielas īpašībām), to var uzskatīt par līdzvērtīgas veiktspējas pierādījumu. Šādos apstākļos jaunās vai modificētās *LLNA* testēšanas metodes validācijas statusu novērtē katrā gadījumā atsevišķi.

Iekšlaboratorijas reproducējamība

8. Lai noteiktu iekšlaboratorijas reproducējamības pakāpi, jaunā vai modificētā *LLNA* metode jāvērtē, izmantojot sensibilizējošu vielu, kura ar *LLNA* jau ir labi izpētīta. Tāpēc *LLNA PS* pamatā ir rezultātu variācija atkārtotos testos ar heksilkanēļskābes aldehīdu (HCA). Lai novērtētu iekšlaboratorijas reproducējamību, novērtētā koncentrācijas sliekšņa (ECt) vērtības ar HCA jāiegūst četrās atsevišķās testēšanas reizēs, testējot ar vismaz nedēļu ilgiem starplaikiem. Iekšlaboratorijas reproducējamības pakāpe ir pieņemama tad, ja laboratorija katrā HCA testēšanā iegūst ECt vērtības robežās no 5 % līdz 20 %, kas atbilst diapazonā 0,5–2,0 esoša skaitļa reizinājumam ar vidējo EC3 vērtību, kas attiecībā uz HCA (10 %) norādīta *LLNA* (skatīt 1. tabulu).

Starplaboratoriju reproducējamība

9. Starplaboratoriju reproducējamības pakāpi jaunai vai modificētai *LLNA* metodei jāvērtē, izmantojot divas sensibilizējošas vielas, kuras ar *LLNA* jau ir labi izpētītas. *LLNA PS* pamatā ir rezultātu variācija testos ar HCA un 2,4-dinitrohlorbenzolu (DNCB) dažādās laboratorijās. ECt vērtības jāiegūst neatkarīgā veidā un no viena pētījuma, kas veikts vismaz trijās atsevišķās laboratorijās. Starplaboratoriju reproducējamības pakāpe ir pieņemama tad, ja katras laboratorijas iegūtās ECt vērtības ir no 5 % līdz 20 % HCA gadījumā un 0,025 % līdz 0,1 % DNCB gadījumā, kas atbilst diapazonā 0,5–2,0 esoša skaitļa reizinājumam ar vidējo EC3 vērtību, kas attiecībā uz HCA (10 %) un DNCB (0,05 %) norādīta *LLNA* (skatīt 1. tabulu).

▼M3

2. papildinājums

Definīcijas

Pareizība: pēc testēšanas metodes iegūto mērījumu rezultātu sakritības pakāpe ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās piemērotības aspektiem. Šo terminu bieži izmanto "atbilstības" vietā, ar to apzīmējot pēc testēšanas metodes iegūto pareizo rezultātu daļu (14).

Salīdzināšanas viela: sensibilizējoša vai nesensibilizējoša viela, ko izmanto par standartu salīdzināšanai ar testējamo vielu. Salīdzināšanas vielai ir jābūt: (i) pastāvīgam un drošam ieguves avotam; (ii) struktūras un funkciju līdzībai ar testējamo vielu klases vielām; (iii) zināmām fizikāli ķīmiskajām īpašībām; (iv) papildu datiem par zināmajiem iedarbības veidiem; (v) vielas zināmajam iedarbības stiprumam jāatbilst vēlamās reakcijas intensitātes diapazonam.

Novērtētais koncentrācijas slieksnis (ECt): novērtētā zemākā testējamās vielas koncentrācija, kurā stimulācijas indekss liecina par pozitīvu reakciju.

Novērtētā koncentrācija-3 (EC3): novērtētā testējamās vielas koncentrācija, kurā stimulācijas indekss ir 3.

Šķietams negatīvs: testējamā viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini identificēta negatīva vai neaktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir pozitīva vai aktīva.

Šķietams pozitīvs: testējamā viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini identificēta pozitīva vai aktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir negatīva vai neaktīva.

Bīstamība: potenciālā spēja kaitēt veselībai vai videi. Kaitīgā iedarbība kļūst nosakāma tikai tad, ja iedarbības intensitāte ir pietiekami liela.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (14).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (14).

Atdarinājuma (me-too) tests: sadzīvisks apzīmējums testēšanas metodei, kura ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīga validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Šāda testēšanas metode varētu kandidēt uz vēlāku validēšanu. Brīvi aizstājama ar tai līdzīgu testēšanas metodi (14).

Galējība jeb rupja kļūda: novērojums, kuru raksturo izteikta novirze no pārējām vērtībām populācijas paraugā, kurš atlasīts pēc nejaušības principa.

Veiktspējas standarti (PS): saskaņā ar validētu testēšanas metodi noteikti standarti, pēc kuriem novērtē funkcionalitātes ziņā vai pēc noteikšanas mehānisma līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Šeit iekļauti: i) testēšanas metodes būtiskie komponenti; ii) obligāti izmantojamās references vielas, kas izraudzītas no tām ķīmiskajām vielām, kuras izmantotas, lai pierādītu attiecīgās validētās testēšanas metodes veiktspējas pieņemamību; iii) līdzīgie pareizības un ticamības līmeņi, kuru pamatā ir attiecīgajai validētajai testēšanas metodei noteiktie konkrētie līmeņi un kuru nodrošināšanu ar novērtējamo testēšanas metodi var pierādīt ar obligāti izmantojamajām references vielām (14).

Aizsargāta testēšanas metode: testēšanas metode, ar kuru saistīto ražošanu un izplatīšanu ierobežo patentu tiesības, autortiesības, tirdzniecības zīmes u. c.

▼**M3**

Kvalitātes nodrošināšana: pārvaldības process, kurā laboratorijas testēšanas standartu, prasību un pierakstu uzturēšanas procedūru ievērošanu un datu pārneses pareizību novērtē no testēšanas veicējiem neatkarīgas personas.

References vielas: ķīmiskas vielas, kas izraudzītas izmantošanai validēšanas procesā un kuru reakcija *in vitro* vai *in vivo* testēšanas standartsistēmā vai pētāmajās sugās ir jau zināma. Šīm ķīmiskajām vielām jābūt reprezentatīvām attiecībā uz to ķīmisko vielu klasi, kuras testē ar attiecīgo metodi, un jāaptver testējamo ķīmisko vielu iespējamo reakciju diapazons (izteikta reakcija, vāja reakcija, nav reakcijas). Dažādos validēšanas procesa posmos var būt vajadzīgas dažādas references vielas; tas pats attiecas uz testēšanas metodēm un to lietojumiem (14).

Piemērotība: testa raksturojums no tā lietderīguma viedokļa; vai tas ir piemērots un izmantojams kādam konkrētam mērķim. Pakāpe, kādā ar minēto testu iespējams pareizi izmērīt vai prognozēt pētāmo bioloģisko ietekmi. Piemērotība ietver arī testēšanas metodes pareizības (atbilstības) aspektu (14).

Ticamība: parametrs, ar kuru mēra pakāpi, kādā tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību (14).

Ādas sensibilizācija: imunoloģisks process, kurš norisinās, ja uz uzņemtspējīgu organismu ārēji iedarbojas stimulējošs ķīmisks alergēns, kas izraisa ādas imūnreakciju, kuras rezultāts var būt kontaktsensibilizācija.

Stimulācijas indekss (SI): vērtība, ko aprēķina, lai novērtētu testējamai vielai piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu; to izsaka kā attiecību starp progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju.

Testējamā viela (arī testējamā ķīmiskā viela): viela vai vielu maisījums, kuru testē ar šo TM.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, par kuru ir pabeigti validācijas pētījumi, lai noteiktu metodes piemērotību noteiktam nolūkam (tostarp pareizību) un ticamību. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (14).

▼B

B.43. ŽURKU NEIROTOKSICITĀTES PĒTĪJUMS

1. METODE

Šī metode ir līdzvērtīga ESAO 424 (1997) vadlīnijā noteiktajai metodei.

Šī testa metode ir paredzēta, lai iegūtu informāciju, kas nepieciešama ķīmisko vielu potenciālās neirotoksicitātes apstiprināšanai vai turpmākai raksturošanai pieaugušos dzīvniekos. To var apvienot ar esošajām atkārtotas devas toksicitātes pētījumu testu metodēm vai veikt kā atsevišķu pētījumu. Ir ieteicams iepazīties ar ESAO Pamatnostādnēm par neirotoksicitātes testēšanas stratēģijām un metodēm (*OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods*) (1), kas palīdzēs veikt pētījumus, kuru pamatā ir šī testa metode. Tas ir īpaši svarīgi, apsverot pārlabojumus novērošanā un testa procedūrās, kas ieteiktas šīs metodes parastajai izmantošanai. Pamatnostādnes ir sagatavotas, lai atvieglotu citu testa procedūru izvēli izmantošanai konkrētos apstākļos.

Attīstības neirotoksicitātes novērtēšana nav šīs metodes temats.

1.1. IEVADS

Pārbaudot un novērtējot ķīmisko vielu toksiskās īpašības, ir svarīgi ņemt vērā neirotoksiskās iedarbības potenciālu. Jau atkārtotās devas sistēmiskās toksicitātes testa metode iekļauj novērojumus potenciālās neirotoksicitātes skrīninga veikšanai. Šo testa metodi var izmantot pētījuma veikšanai, lai iegūtu vairāk informācijas par atkārtotās devas sistēmiskās toksicitātes pētījumos novēroto neirotoksisko iedarbību vai to apstiprinātu. Tomēr apsvērumi par dažu klašu ķīmisko vielu potenciālo neirotoksicitāti var vedināt uz domām, ka tās var atbilstošāk novērtēt, izmantojot šo metodi, bez potenciālās neirotoksicitātes iepriekšējām norādēm no atkārtotās devas sistēmiskās toksicitātes pētījumiem. Piemēram, šādos apsvērumos jāiekļauj:

— neiroloģisko pazīmju vai neiropatoloģisko bojājumu novērojumi toksicitātes pētījumos, kas nav atkārtotās devas sistēmiskās toksicitātes pētījumi, vai

— struktūras radniecība vai citu informācija, kas tās saista ar zināmām neirotoksiskām vielām.

Turklāt var būt citi gadījumi, kad ir lietderīgi izmantot šo testa metodi; sīkākus datus skatīt (1).

Šī metode ir izveidota tā, lai to varētu pielāgot konkrētu vajadzību apmierināšanai, lai apstiprinātu ķīmiskās vielas konkrētu histopatoloģisko un izturēšanās neirotoksicitāti, kā arī sniegtu neirotoksisko atbildes reakciju raksturojumu un kvantitatīvu novērtējumu.

▼B

Agrāk neirotoksicitāti pielīdzināja neiropātijai, kas iekļauj neiropatoloģiskos bojājumus vai neiroloģiskas disfunkcijas – krampji, paralīze vai drebēšana. Lai gan neiropātija ir svarīga neirotoksicitātes izpausme, tagad ir skaidrs, ka ir daudzas citas nervu sistēmas toksicitātes pazīmes (piemēram, kustību koordinācijas zudums, jutības deficīts, mācīšanās un atmiņas disfunkcijas), kas var neatspoguļoties neiropātijas vai citu veidu pētījumos.

Šī neirotoksicitātes testa metode ir izstrādāta, lai konstatētu lielākās neiroizturēšanās un neiropatoloģiskās iedarbības pieaugušiem grauzējiem. Kaut arī izturēšanās, pat nepastāvot morfoloģiskām izmaiņām, var atspoguļot blakusparādības uz organismu, ne visas izturēšanās izmaiņas ir specifiskas nervu sistēmai. Tādēļ novērotās izmaiņas ir jānovērtē saistībā ar korelatīviem histopatoloģijas, hematoloģijas vai bioķīmijas datiem, kā arī ar citu veidu sistēmiskās toksicitātes datiem. Testēšana, kas šajā metodē vajadzīga, lai nodrošinātu neirotoksisko atbildes reakciju raksturojumu un kvantitatīvo izvērtējumu, iekļauj īpašas histopatoloģiskas un izturēšanās procedūras, ko turpmāk var papildināt ar elektrofizioloģiskiem vai bioķīmiskiem pētījumiem (1) (2) (3) (4).

Neirotoksiskās vielas nervu sistēmā var iedarboties uz vairākiem mērķiem un atbilstoši dažādiem mehānismiem. Tā kā neviena atsevišķa testu kopa nevar rūpīgi novērtēt visu vielu neirotoksisko potenciālu, var būt nepieciešams izmantot citus *in vitro* un *in vivo* testus, kas specifiski novērotajam vai sagaidāmajam neirotoksicitātes veidam.

Šo testa metodi var izmantot arī saistībā ar norādījumu kopu, kas izklāstīta ESAO Pamatnostādnēs par neirotoksicitātes testēšanas stratēģijām un metodēm (1), lai plānotu pētījumus, kas paredzēti, lai turpmāk raksturotu vai palielinātu atbildes reakcijas uz devu kvantitatīvās novērtēšanas jutību labākai nenovērotas nelabvēlīgas ietekmes līmeņa noteikšanai vai ķīmiskās vielas zināmās vai paredzamās bīstamības pamatošanai. Piemēram, var plānot pētījumus neirotoksisko mehānismu identificēšanai un novērtēšanai vai datu papildināšanai, kas jau pieejami no neiroizturēšanās un neiropatoloģisko pamatnovērojumu procedūru izmantošanas. Tādos pētījumos nav jākopē dati, kas iegūti, izmantojot šajā metodē ieteiktās standartprocedūras, ja tādi dati jau ir pieejami un netiek uzskatīti par nepieciešamiem pētījuma rezultātu interpretācijai.

Šis neirotoksicitātes pētījums, izmantots atsevišķi vai apvienojumā, nodrošina informāciju, kas var:

— identificēt, vai testējamā ķīmiskā viela ir neatgriezeniski vai atgriezeniski iedarbojusies uz nervu sistēmu,

— dot ieguldījumu ar ķīmiskās vielas iedarbību saistīto nervu sistēmas izmaiņu raksturošanā un pamatā esošā mehānisma izpratnē,

▼B

— noteikt atbildes reakcijas sakarību ar devu un laiku, lai novērtētu nenovērotās nelabvēlīgas ietekmes līmeni (ko var izmantot ķīmiskās vielas drošības kritēriju noteikšanai).

Šajā testa metodē izmanto perorālo testējamās vielas ievadīšanu. Var būt piemērotāki citi ievadīšanas veidi (piemēram, caur ādu vai ieelpojot), un var būt vajadzīga ieteikto procedūru pārveidošana. Apsvērumi par ievadīšanas veida izvēli ir atkarīgi no iedarbības veida uz cilvēku un pieejamās toksikoloģiskās vai kinētiskās informācijas.

1.2. DEFINĪCIJAS

Kaitīgā iedarbība: tādas ar vielas ievadīšanu saistītas izmaiņas attiecībā pret bāzes līniju, kuras samazina organisma spēju izdzīvot, vairoties vai pielāgoties videi.

Deva: ievadītās testējamās vielas daudzums. Devu izsaka kā svaru (g/mg) vai kā testējamās vielas svaru uz testa dzīvnieka svara vienību (piemēram, mg/kg), vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas).

Dozēšana: vispārīgs termins, kas iekļauj devu, tās biežumu un ievadīšanas ilgumu.

Neirotoksicitāte: nervu sistēmas struktūras vai funkciju nevēlamas izmaiņas, ko rada ķīmiska, bioloģiska vai fizikāla aģenta iedarbība.

Neirotoksiska viela: ķīmisks, bioloģisks vai fizikāls aģents, kuram ir neirotoksicitātes izraisīšanas spēja.

NOAEL: saīsinājums no "*no observed adverse effect level*" (nenovērojamas nelabvēlīgas ietekmes līmenis), un tas ir lielākais devas līmenis, pie kura nav novērojami ar vielas ievadīšanu saistīti nevēlami rezultāti.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Testējamo vielu ievada orāli devu diapazonā vairākām laboratorijas grauzēju grupām. Parasti ir vajadzīgas atkārtotās devas, un dozēšanas režīms var būt 28 dienas, subhronisks (90 dienas) vai hronisks (1 gads vai ilgāk). Šajā testa metodē izklāstītās procedūras var izmantot arī akūtās neirotoksicitātes pētījumā. Dzīvniekus testē, lai varētu konstatēt vai raksturot izturēšanos un/vai neiroloģiskās anomālijas. Katrā novērošanas laika posmā vērtē izturēšanās veidus, ko varētu ietekmēt neirotoksiskās vielas. Testa beigās katra dzimuma dzīvnieku apakškopai no katras grupas izdara perfūziju *in situ*, kā arī sagatavo un apskata galvas un muguras smadzeņu un perifēro nervu griezumus.

Ja pētījumu veic kā atsevišķu pētījumu neirotoksicitātes skrīninga izdarīšanai vai neirotoksisko iedarbību raksturošanai, katras grupas dzīvniekus, ko neizmanto perfūzijai un vēlākai histopatoloģijai (skatīt 1. tabulu), var izmantot specifiskām neiroizturēšanās, neiropatoloģiskām, neiroķīmiskām vai elektrofizioloģiskām procedūrām, kuras var papildināt datus, kas iegūti no šai metodei vajadzīgajiem standarta izmeklējumiem (1). Minētās papildu procedūras var būt īpaši noderīgas, ja empīriskie novērojumi vai sagaidāmās iedarbības norāda uz ķīmiskās vielas neirotoksicitātes konkrētu veidu vai mērķi. Alternatīvi – atlikušos dzīvniekus var izmantot tādiem novērtējumiem, kas vajadzīgi atkārtotās devas toksicitātes testu metodēm pētījumos ar grauzējiem.

▼B

Ja šīs testa metodes procedūras apvieno ar citu testu metožu procedūrām, ir vajadzīgs pietiekams dzīvnieku skaits, lai izpildītu novērojumu prasības abiem pētījumiem.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sugu izvēle**

Ieteicamākā grauzēju suga ir žurkas, kaut arī, sniedzot pamatojumu, var izmantot citas grauzēju sugas. Ir jāizmanto jauni, veseli, pieauguši parasti izmantojamo laboratorijas līniju dzīvnieki. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Dozēšana parasti jāuzsāk iespējami drīz pēc atšķiršanas no mātes, vēlams, ne vēlāk kā sešu nedēļu veciem dzīvniekiem un katrā ziņā pirms dzīvnieki ir deviņas nedēļas veci. Tomēr, ja šo pētījumu apvieno ar citiem pētījumiem, šai vecuma prasībai var būt vajadzīga pielāgošana. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no katra dzimuma dzīvnieku vidējā svara. Ja atkārtotās devas īslaicīgu pētījumu izdara kā ilgtermiņa pētījuma iepriekšēju pētījumu, ir ieteicams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

1.4.2. **Turēšanas un barošanas nosacījumi**

Eksperimenta dzīvnieku telpas temperatūrai jābūt 22 °C (± 3 °C). Kaut arī relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, nav jāpārsniedz 70 %, izņemot telpu tīrīšanas laiku, mērķim jābūt 50–60 %. Apgaismojumam jābūt mākslīgam, secība ir 12 stundas gaismas, 12 stundas tumsas. Skaļš, neregulārs troksnis iespējami jāsamazina. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šo metodi. Dzīvniekus var turēt atsevišķi vai būros nelielās tā paša dzimuma dzīvnieku grupās.

1.4.3. **Dzīvnieku sagatavošana**

Veselus, jaunus dzīvniekus pēc nejaušās izvēles principa sadala kontroles un vielas saņemšanas grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Dzīvniekiem piešķir unikālu identifikāciju, un līdz izmēģinājumu sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

1.4.4. **Ievadīšanas veids un devu sagatavošana**

Šajā testa metodē izmanto perorālo testējamās vielas ievadīšanu. Perorālā ievadīšana var notikt ar mākslīgo barošanu, barībā, dzeramajā ūdenī vai ar kapsulām. Var izmantot citus ievadīšanas veidus (piemēram, caur ādu vai ieelpojot), bet var būt vajadzīga ieteikto procedūru pārveidošana. Apsvērumi par ievadīšanas veida izvēli ir atkarīgi no iedarbības rakstura uz cilvēku un pieejamās toksikoloģiskās vai kinētiskās informācijas. Ievadīšanas veida izvēles motīvi, kā arī izrietošie šīs testa metodes procedūru pārlabojumi ir jānorāda.

▼B

Vajadzības gadījumā testējamo vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Ir ieteicams vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas lietošanu, pēc tam apsvērt eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīduma/suspensijas lietošanu un pēc tam iespējamu šķīdumu/suspensiju citā nesējā. Nesēja toksiskajām īpašībām jābūt zināmām. Turklāt jāņem vērā šādas nesēja īpašības – nesēja iedarbība uz testējamās vielas uzsūkšanos, sadalījumu, metabolismu vai aizturi, kas var mainīt testējamās vielas toksiskās īpašības, un barības un ūdens patēriņa iedarbību uz dzīvnieku barojuma stāvokli.

1.5. PROCEDŪRAS

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Ja pētījumu veic kā atsevišķu pētījumu, sīki izstrādātu klīnisko un funkcionālo novērojumu izvērtēšanai katrā devas un kontroles grupā ir jāizmanto vismaz 20 dzīvnieki (10 tēviņi un 10 mātītes). Vismaz pieciem tēviņiem un piecām mātītēm, kas izraudzīti no minētajiem 10 tēviņiem un 10 mātītēm, ir jāizdara perfūzija *in situ*, un tie jāizmanto sīki izstrādātai neirohistopatoloģijai pētījuma beigās. Ja konkrētā devas grupā attiecībā uz neirotoksiskajām iedarbībām tiek novērots tikai ierobežots dzīvnieku skaits, jāapsver šo dzīvnieku iekļaušana perfūzijas izdarīšanai izraudzītajos dzīvniekos. Ja pētījumu veic apvienojumā ar atkārtotās devas toksicitātes pētījumu, ir jāizmanto pietiekams dzīvnieku skaits, lai atbilstu abu pētījumu mērķiem. Minimālais dzīvnieku skaits grupā dažādiem pētījumu apvienojumiem ir norādīts 1. tabulā. Ja plāno starpposmu nogalināšanas vai atveseļošanās grupas, lai novērotu toksiskās iedarbības atgriezeniskumu, noturīgumu vai aizkavētu parādīšanos pēc vielas saņemšanas, vai ja ir apsvērtas papildu novērošanas, tad dzīvnieku skaits ir jāpalielina, lai nodrošinātu, ka ir pieejams novērojumiem un histopatoloģijai vajadzīgais dzīvnieku skaits.

1.5.2. **Vielas saņemšanas un kontroles grupa**

Parasti jāizmanto vismaz trīs devu grupas un kontroles grupa, bet, ja no citu datu izvērtēšanas nav sagaidāma iedarbība pie atkārtotās devas 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, tad var izdarīt pieļaujamības testu. Ja piemēroti dati nav pieejami, var izdarīt diapazona atrašanas pētījumu, kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo vielu. Ja testējamo vielu ievada kopā ar nesēju, kontroles dzīvnieki saņem maksimālo izmantojamo nesēja daudzumu.

1.5.3. **Ticamības pārbaude**

Pētījuma veicējai laboratorijai ir jāuzrāda dati, kas parāda tās spēju veikt pētījumu un izmantojamo procedūru jutību. Tādiem datiem jāsniedz pierādījumi par spēju dažādos novērošanai ieteiktos beigu punktos attiecīgi konstatēt un kvantitatīvi noteikt izmaiņas, tādas kā veģetatīvās pazīmes, sensoro reaktivitāte, ekstremitāšu satvēriena stiprums un kustību aktivitāte. Informācija par ķīmiskajām vielām, kas izraisa dažādu veidu neirotoksiskās atbildes reakcijas un ir izmantojamas kā pozitīvās kontroles vielas, ir atrodama 2.–9. norādē. Var izmantot iepriekšējos datus, ja eksperimenta procedūru būtiskie aspekti paliek tie paši. Ir ieteicams regulāri atjaunināt vēsturiskos datus. Ja pētījuma veicēja laboratorija ir mainījusi kādu testa vai procedūru nozīmīgu sastāvdaļu, ir jāiegūst jauni dati, kas parāda procedūru saglabātu jutību.

▼B

1.5.4. **Devu izvēle**

Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā iepriekš novērotos toksicitātes un kinētikas datus, kas ir pieejami par testējamo vielu vai ar to saistītiem materiāliem. Augstākais devas līmenis ir jāizvēlas ar mērķi izraisīt neirotoksiskas iedarbības vai skaidras sistēmiskas toksiskas iedarbības. Pēc tam jāizvēlas devu līmeņi lejupejošā secībā, lai parādītu visas ar devām saistītās atbildes reakcijas un lai zemākajā devas līmenī nenovēro nelabvēlīgas ietekmes līmeni (*NOAEL*). Principā devu līmeņi ir jāizvēlas tā, lai primārā toksiskā iedarbība uz nervu sistēmu būtu atšķirama no iedarbības, kas saistīta ar sistēmisko toksicitāti. Bieži optimāli ir divi līdz trīs starplaiki, un ceturtās testa grupas pievienošana bieži ir vēlamāka par ļoti lielu starplaiku (piemēram, ar koeficientu, lielāku par 10) izmantošanu starp dozēšanām. Ja ir pamatots iedarbības uz cilvēku vērtējums, arī tas jāņem vērā.

1.5.5. **Pieļaujamības tests**

Ja novērojamu neirotoksisku iedarbību neizraisa tests ar devas līmeni vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā, izmantojot aprakstītās procedūras, un ja toksicitāte nav sagaidāma, pamatojoties uz datiem par struktūras ziņā saistītām vielām, tad pētījumu ar trim devu līmeņiem var uzskatīt par nevajadzīgu. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt, ka pieļaujamības testā jālieto lielāka perorālā deva. Citiem ievadīšanas veidiem, tādiem kā ieelpošana vai ievadīšana caur ādu, maksimālo sasniedzamo iedarbības līmeni bieži var diktēt testējamās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības. Perorāla akūtā pētījuma veikšanai pieļaujamības testa devai jābūt vismaz 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Devu ievadīšana**

Dzīvniekiem testējamo vielu dozē katru dienu septiņas dienas nedēļā vismaz 28 dienu laika posmā; piecu dienu dozēšanas režīms vai īsāks iedarbības laika posms ir jāpamato. Ja testējamo vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jāizdara vienā devā, izmantojot kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas kanulu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara. Tomēr ūdens šķīdumu gadījumā var apsvērt līdz 2 ml/100 g ķermeņa svara izmantošanu. Izņemot kairinošas vai kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, testiem lietotā tilpuma mainības iedarbība ir jāsamazina līdz minimumam, koriģējot koncentrāciju tā, lai pie visām devām tilpums būtu vienāds.

Vielām, ko ievada ar barību vai dzeramo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, lai iesaistītie testējamās vielas daudzumi netraucētu normālu barības vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo vielu ievada ar barību, var izmantot nemainīgu koncentrāciju barībā (milj. daļas) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru; jebkura atkāpe no šīs shēmas ir jāpamato. Ja vielu ievada, mākslīgi barojot, deva katru dienu jāievada vienā laikā un pēc vajadzības jākoriģē, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja atkārtotās devas pētījumu izmanto kā ilgtermiņa pētījuma iepriekšēju pētījumu, abos pētījumos jāizmanto līdzīga veida barība. Akūtos pētījumos, ja nav iespējams uzreiz ievadīt visu devu, to sadala un ievada pa daļām laika posmā, kas nepārsniedz 24 stundas.

▼B

1.6. NOVĒROŠANA

1.6.1. **Novērošanas un testu biežums**

Atkārtotās devas pētījumos novērošanas laika posmam jāietver dozēšanas laika posms. Akūtajos pētījumos ir jāievēro 14 dienu laika posms pēc vielas ievadīšanas. Bez vielas iedarbības turēto satelītgrupu dzīvnieku novērošanā arī jāiekļauj šis laika posms pēc vielas ievadīšanas.

Novērojumi jāizdara pietiekami bieži, lai iespējami palielinātu izturēšanās un/vai neiroloģisko anomāliju konstatēšanas iespēju. Novērojumi, vēlams, jāveic katru dienu vienos un tajos pašos laikos, ņemot vērā sagaidāmo iedarbību maksimuma periodu pēc dozēšanas. Klīnisko novērojumu un funkcionālo testu biežums ir apkopots 2. tabulā. Ja iepriekšējos pētījumos iegūtie kinētiskie vai citi dati norāda uz vajadzību pēc novērojumiem, testiem vai pēcnovērojumu periodiem izmantot atšķirīgus laika punktus, ir jāpieņem alternatīvs grafiks, lai iegūtu maksimālo informāciju. Ir jāsniedz grafika izmaiņu motīvi.

1.6.1.1. *Vispārējā veselības stāvokļa novērojumi un mirstība/saslimstība*

Visi dzīvnieki ir rūpīgi jānovēro vismaz vienreiz dienā attiecībā uz to veselības stāvokli, kā arī vismaz divreiz dienā attiecībā uz saslimstību un mirstību.

1.6.1.2. *Sīki izstrādāti klīniskie novērojumi*

Sīki izstrādāti klīniskie novērojumi jāveic attiecībā uz visiem šim nolūkam izraudzītajiem dzīvniekiem (skatīt 1. tabulu) vienreiz pirms pirmās iedarbības (lai varētu izdarīt individuāla pētījuma objekta stāvokļu salīdzinājumus) un pēc tam dažādos starplaikos atkarībā no pētījuma ilguma (skatīt 2. tabulu). Atveseļošanās perioda beigās jāveic sīki izstrādāti atveseļošanās satelītgrupas klīniskie novērojumi. Sīki klīniskie novērojumi jāveic ārpus turēšanas būra standartnožogojumā. Tie rūpīgi jāreģistrē, izmantojot punktu sistēmas, kas iekļauj katra novērojumu mērījuma kritērijus vai punktu skalas. Testēšanas laboratorijai skaidri jānosaka kritēriji vai skalas. Ir jācenšas nodrošināt, lai izmaiņas testa apstākļos būtu minimālas (nebūtu sistemātiski saistītas ar vielas ievadīšanu) un lai novērošanu izdarītu apmācīti novērotāji, kas nav informēti par vielas ievadīšanu.

Novērojumus ieteicams izdarīt strukturētā veidā, katram dzīvniekam katrā novērošanas laikā sistemātiski pielietojot skaidri noteiktus kritērijus (iekļaujot "parastā diapazona" definīciju). "Parastais diapazons" ir atbilstoši jādokumentē. Visas novērotās pazīmes ir jāreģistrē. Kad vien tas īstenojams, ir jāreģistrē arī novēroto pazīmju lielums. Klīniskajos novērojumos jāiekļauj izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrēcijas un izdalījumi un veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes lielums, neparasts elpošanas raksturs un/vai elpošana caur muti, neparastas urinācijas vai defekācijas pazīmes un izmainītas krāsas urīns), bet nav jāaprobežojas ar tiem.

▼B

Jāatzīmē arī neparastas atbildes reakcijas attiecībā uz ķermeņa stāvokli, aktivitātes līmeni (piemēram, samazināta vai pastiprināta standartiežogojuma pētīšana) un kustību koordināciju. Jāreģistrē izmaiņas gaitā (piemēram, gāzelēšanās, ataksija), stājā (piemēram, sakumpusi mugura) un reaģēšanā uz manipulācijām, novietošanu vai citiem vides stimuliem, kā arī klonisko vai tonisko kustību esamība, krampji vai drebēšana, stereotipi (piemēram, pārmērīga kopšanās, neparastas galvas kustības, atkārtota griešanās) vai dīvaina izturēšanās (piemēram, košana vai pārmērīga laizīšana, pašsakropļošanās, staigāšana atpakaļvirzienā, skaņu izdošana) vai agresija.

1.6.1.3. *Funkcionālie testi*

Tāpat kā sīki klīniskie novērojumi arī funkcionālie testi ir jāizdara vienreiz pirms iedarbības un bieži pēc tās visiem dzīvniekiem, kas šim nolūkam izraudzīti (skatīt 1. tabulu). Funkcionālās testēšanas biežums arī ir atkarīgs no pētījuma ilguma (skatīt 2. tabulu). Papildus novērošanas periodiem, kas norādīti 2. tabulā, funkcionālie atveseļošanās satelītgrupu novērojumi arī jāveic iespējami tuvu nogalināšanas laikam. Funkcionālajiem testiem jāiekļauj sensorā reaktivitāte uz dažādu modalitāšu stimuliem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem stimuliem (5) (6) (7)), ekstremitāšu tvērējstipruma vērtējums (8) un kustību aktivitātes vērtējums (9). Kustību aktivitāte jāmēra ar automatizētu ierīci, kas var konstatēt aktivitātes palielinājumus un samazinājumus. Ja izmanto citu noteiktu sistēmu, tai jābūt kvantitatīvai un ir jāparāda tās jutība un ticamība. Katra ierīce ir jātestē, lai nodrošinātu tās ticamību laika gaitā un atbilstību starp ierīcēm. Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajā literatūras sarakstā. Ja nav datu (piemēram, struktūras–aktivitātes dati, epidemioloģiskie dati, citi toksikoloģiskie pētījumi), kas norādītu uz potenciālām neirotoksiskām iedarbībām, ir jāapsver specializētāku sensorās un kustību funkcijas vai mācīšanās un atmiņas testu iekļaušana, lai iespējamās iedarbības izpētītu sīkāk. Vairāk informācijas par specializētiem testiem un to izmantošanu ir sniegts literatūras sarakstā (1).

Izņēmuma gadījumā dzīvniekiem, kas uzrāda toksicitātes pazīmes tādā mērā, kas būtiski traucē funkcionālo testu, attiecīgo testu var neizdarīt. Dzīvnieku izslēgšana no funkcionālā testa ir jāpamato.

1.6.2. **Ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš**

Līdz 90 dienu ilgos pētījumos dzīvnieki jāsver vismaz reizi nedēļā un vismaz reizi nedēļā ir jāmēra barības patēriņš (ja testējamo vielu ievada ar ūdeni, jāmēra ūdens patēriņš). Ilgtermiņa pētījumos visi dzīvnieki pirmo 13 nedēļu laikā ir jāsver vismaz reizi nedēļā un pēc tam vismaz vienreiz katrās četrās nedēļās. Izmēģinājuma pirmo 13 nedēļu laikā barības patēriņš (ūdens patēriņš, ja testējamo vielu ievada ar dzeramo ūdeni) jāmēra vismaz katru nedēļu un pēc tam apmēram ik pēc trim mēnešiem, ja vien veselības stāvokļa vai ķermeņa svara izmaiņu dēļ nav jārīkojas citādi.

▼B

1.6.3. **Oftalmoloģija**

Pētījumos, kas ilgāki par 28 dienām, pirms testējamās vielas ievadīšanas un pētījuma beigās jāveic, ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja konstatē izmaiņas acīs vai ja klīnisko pazīmju dēļ ir vajadzīgs, jāizmeklē visi dzīvnieki. Ilgtermiņa pētījumos arī oftalmoloģiskā izmeklēšana jāveic ar 13 nedēļu starplaikiem. Oftalmoloģiskā izmeklēšana nav jāizdara, ja attiecīgie dati jau ir pieejami no citiem līdzīga ilguma un līdzīgu devu līmeņu pētījumiem.

1.6.4. **Hematoloģija un klīniskā bioķīmija**

Ja neirotoksicitātes pētījumu veic apvienojumā ar atkārtotās devas sistēmiskās toksicitātes pētījumu, hematoloģiskie izmeklējumi un klīniskās bioķīmijas noteikšana ir jāizdara, kā norādīts sistēmiskās toksicitātes pētījuma attiecīgajā metodē. Paraugu vākšana ir jāizdara tā, lai iespējami samazinātu potenciālo iedarbību uz neiroizturēšanos.

1.6.5. **Histopatoloģija**

Neiropatoloģiskā apskate ir jāplāno, lai papildinātu un paplašinātu pētījuma *in vivo* fāzes laikā izdarītos novērojumus. Audi no vismaz pieciem dzīvniekiem uz dzimumu katrā grupā (skatīt 1. tabulu un nākamo daļu) ir jāfiksē *in situ*, izmantojot vispāratzītas perfūzijas un fiksācijas metodes (skatīt literatūras saraksta (3) 5. nodaļu un literatūras saraksta (4) 50. nodaļu). Jāreģistrē novērotās makroskopiskās izmaiņas. Ja pētījumu veic kā atsevišķu skrīninga pētījumu attiecībā uz neirotoksicitāti vai lai raksturotu neirotoksiskās iedarbības, atlikušos dzīvniekus var izmantot specifiskiem neiroizturēšanās (10) (11), neiropatoloģiskām (10) (11) (12) (13), neiroķīmiskām (10) (11) (14) (15) vai elektrofizioloģiskām (10) (11) (16) (17) procedūrām, kas var papildināt šeit aprakstītās procedūras un izmeklējumus, vai arī palielināt histopatoloģiski apskatīto dzīvnieku skaitu. Papildu procedūras ir īpaši noderīgas, ja empīriskie novērojumi vai sagaidāmās iedarbības norāda uz ķīmiskās vielas neirotoksicitātes konkrētu veidu vai mērķi (2) (3). Alternatīvi atlikušos dzīvniekus var izmantot arī parastai patoloģijas novērtēšanai, kā aprakstīts atkārtotās devas pētījumu metodē.

Vispārējas iekrāsošanas procedūra, piemēram, ar hematoksilīnu un eozīnu (H&E), ir jāizdara visiem audu paraugiem, kas aplieti ar parafīnu, un jāizdara apskate mikroskopā. Ja ir novērotas perifērās neiropātijas pazīmes vai par tām ir aizdomas, ir jāizdara ar plastmasu pārklātu perifēro nervu paraugu izmeklēšana. Klīniskās pazīmes var rosināt izmeklēt arī citas vietas vai izmantot īpašas iekrāsošanas procedūras. Norādījumus par izmeklējamām papildu vietām var atrast (3) (4). Lai parādītu konkrētus patoloģisko izmaiņu veidus, var būt noderīgi arī atbilstoši īpaši iekrāsojumi (18).

▼B

Histoloģiski jāizmeklē reprezentatīvas centrālās un perifērās nervu sistēmas daļas (skatīt literatūras saraksta (3) 5. nodaļu un literatūras saraksta (4) 50. nodaļu). Izmeklējamo vietu skaitā parasti jāiekļauj – priekšējās smadzenes, lielo smadzeņu centrs, iekļaujot griezumu caur hipokampu, vidējās smadzenes, smadzenītes, tilts, garenās smadzenes, acs ar acs nervu un tīkleni, muguras smadzenes kakla un muguras paresninājumos, dorsālās saknītes gangliji, dorsālās un vēdera saknes šķiedras, proksimālais sēžas nervs, proksimālais tibiālais nervs (pie ceļa) un tibiālā nerva apakšstilba muskuļa zari. Muguras smadzeņu un perifēro nervu griezumiem jāiekļauj šķērsgriezums un garengriezums. Jāpievērš uzmanība nervu sistēmas asinsvadu tīklam. Jāapskata arī skeleta muskuļa, jo īpaši apakšstilba muskuļa paraugs. Īpaša uzmanība jāpievērš vietām ar šūnu un šķiedru struktūru un īpašībām centrālajā nervu sistēmā un perifērajā nervu sistēmā, kas ir zināmas kā īpaši iedarbīgas uz neirotoksiskām vielām.

Norādījumi par neiropatoloģiskām izmaiņām, ko parasti rada toksisko vielu iedarbība, ir atrodami literatūras sarakstā (3) (4). Ir ieteicama audu paraugu pakāpeniska apskate, kurā griezumus no lielākās devas grupas vispirms salīdzina ar kontroles grupas griezumiem. Ja paraugos no šīm grupām neiropatoloģiskas izmaiņas nav novērojamas, turpmāka analīze nav vajadzīga. Ja lielākās devas grupā novērotas neiropatoloģiskas izmaiņas, potenciāli ietekmēto audu paraugi no vidējās un mazākās devas grupām ir jākodē un secīgi jāizmeklē.

Ja kvalitatīvajā izmeklēšanā ir atrasti neiropatoloģisku izmaiņu pierādījumi, jāveic otra izmeklēšana visos nervu sistēmas apvidos, kuros parādījušās izmaiņas. Griezumus no katra potenciāli cietušā apvidus visās devu grupās ir jākodē un jāizmeklē pēc nejaušās izvēles, nezinot kodu. Katra bojājuma biežums un smagums ir jāreģistrē. Pēc tam, kad visi apvidi no visām devu grupām ir novērtēti, kodu var atklāt un izdarīt statistisko analīzi, lai novērtētu devas sakarību ar atbildes reakciju. Jāapraksta katra bojājuma dažādās smaguma pakāpes.

Neiropatoloģiskie rezultāti jānovērtē izturēšanās novērojumu un mērījumu, kā arī citu datu no iepriekšējiem un vienlaicīgiem sistēmiskās toksicitātes pētījumiem kontekstā.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Jānorāda dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulas veidā, katrai testa vai kontroles grupai parādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, dzīvnieku skaitu, kas testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nogalināti, un katras nobeigšanās vai humānas nogalināšanas laiku, dzīvnieku skaitu, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, iekļaujot toksisko iedarbību sākuma laiku, ilgumu un smagumu, dzīvnieku skaitu, kam novēroti audu bojājumi, iekļaujot bojājumu veidus un smagumu.

▼B

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pētījuma rezultāti jāvērtē neiroizturēšanās un neiropatoloģisko iedarbību (arī neiroķīmisko vai elektrofizoloģisko iedarbību, ja ir iekļauti papildu izmeklējumi), kā arī citu novēroto kaitīgo iedarbību biežuma, smaguma un korelāciju izteiksmē. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes jāizvēlas, plānojot pētījumu.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības (iekļaujot izomērismu, tīrību un fizikāli ķīmiskās īpašības),

— identifikācijas dati.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, aklimatizācija, barība utt.,

— atsevišķo dzīvnieku svars testa sākumā.

Testa apstākļi:

— sīkas ziņas par testējamās vielas preparāta/barības sagatavošanu, iegūto koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— ievadīto devu specifikācija, iekļaujot sīkas ziņas par ievadītā materiāla nesēju, tilpumu un fizikālo formu,

— sīkas ziņas par testējamās vielas ievadīšanu,

— izraudzīto devu līmeņu pamatojums,

— iedarbības veida un ilguma pamatojums,

— testējamās vielas koncentrācijas (milj. daļas) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa svara dienā) attiecīgā gadījumā,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti.

Novērojumu un testa procedūras:

— sīki dati par katras grupas dzīvnieku iedalīšanu perfūzijas apakšgrupās,

— sīki dati par vērtēšanas sistēmām, iekļaujot katra mērījuma kritērijus un vērtēšanas skalas sīki izstrādātos klīniskajos novērojumos,

▼B

— sīki funkcionālo testu dati par sensoro reaktivitāti uz dažādu modalitāšu stimuliem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem stimuliem); par ekstremitāšu tvēriena stipruma novērtējumu; par kustību aktivitātes vērtējumu (iekļaujot sīkus aktivitātes konstatēšanas automātisko ierīču datus); citas izmantotās procedūras,

— sīki oftalmoloģisko izmeklējumu dati un attiecīgā gadījumā hematoloģiskie izmeklējumi un klīniskās bioķīmijas testi ar attiecīgām bāzes līnijas vērtībām,

— sīki dati par konkrētām neiroizturēšanās, neiropatoloģijas, neiroķīmiskām vai elektrofizioloģiskām procedūrām.

Rezultāti:

— ķermeņa svars/ķermeņa svara izmaiņas, iekļaujot ķermeņa svaru pie nogalināšanas,

— barības patēriņš un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,

— dati par toksisko atbildes reakciju pa dzimumiem un devu līmeņiem, iekļaujot toksicitātes pazīmes vai mirstību,

— sīki izstrādātu klīnisko novērojumu (atgriezenisku vai neatgriezenisku) raksturs, smagums un ilgums (parādīšanās laiks un turpmākā gaita),

— visu funkcionālo testu rezultātu sīks apraksts,

— autopsijas rezultāti,

— visu neiroizturēšanās, neiropatoloģijas un neiroķīmisko vai elektrofizioloģisko rezultātu sīks apraksts, ja tie pieejami,

— uzsūkšanās un metabolisma dati, ja tie ir pieejami,

— rezultātu statistiskā apstrāde attiecīgā gadījumā.

Rezultātu izvērtējums:

— informācija par atbildes reakciju uz devu,

— citu toksisko iedarbību sakarība ar secinājumu par testējamās ķīmiskās vielas neirotoksisko potenciālu,

— nenovērojamas nelabvēlīgas ietekmes līmenis.

Secinājumi:

— ir vēlams konkrēts paziņojums par testējamās ķīmiskās vielas vispārējo neirotoksicitāti.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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 Organisation (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. 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, p. 999–1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 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, p. 267–283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 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, p. 599–609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). 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. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 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. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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

1. tabula

Minimālais grupā vajadzīgais dzīvnieku skaits, ja neirotoksicitātes pētījumu veic atsevišķi vai apvienojumā ar citiem pētījumiem

	NEIROTOKSICITĀTES PĒTĪJUMU VEIC KĀ			
	atsevišķu pētījumu	apvienotu pētījumu ar 28 dienu pētījumu	apvienotu pētījumu ar 90 dienu pētījumu	apvienotu pētījumu ar hroniskās toksicitātes pētījumu
Kopējais dzīvnieku skaits grupā	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	15 sievišķā un 15 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	25 sievišķā un 25 vīrišķā dzimuma dzīvnieki
Dzīvnieku skaits, kas izraudzīts funkcionālajai testēšanai, iekļaujot sīki izstrādātus klīniskos novērojumus	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	10 sievišķā un 10 vīrišķā dzimuma dzīvnieki
Dzīvnieku skaits, kas izraudzīts perfūzijai *in situ* un neirohistopatoloģijai	5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki
Dzīvnieku skaits, kas izraudzīts atkārtotās devas/subhroniskās/hroniskās toksicitātes novērojumiem, hematoloģijai, klīniskajai bioķīmijai, histopatoloģijai utt., kā norādīts attiecīgajos *Norādījumos*		5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki	10 sievišķā † un 10 vīrišķā † dzimuma dzīvnieki	20 sievišķā † un 20 vīrišķā † dzimuma dzīvnieki
Papildu novērojumi attiecīgā gadījumā	5 sievišķā un 5 vīrišķā dzimuma dzīvnieki			

† – Iekļauj piecus dzīvniekus, kas izraudzīti funkcionālajai testēšanai un sīki izstrādātiem klīniskajiem novērojumiem kā daļa no neirotoksicitātes pētījuma.

▼B

2. tabula

Klīnisko novērojumu un funkcionālo testu biežums

Novērojumu veids		Pētījuma ilgums			
		Akūts	28 dienas	90 dienas	Hronisks
Visiem dzīvniekiem	Vispārējais veselības stāvoklis	katru dienu	katru dienu	katru dienu	katru dienu
	Mirstība/ saslimstība	divreiz dienā	divreiz dienā	divreiz dienā	divreiz dienā
Dzīvniekiem, kas izraudzīti funkcionālajiem novērojumiem	Sīki izstrādāti klīniskie novērojumi	— pirms pirmās iedarbības — 8 stundu laikā pēc dozēšanas aplēstajā maksimālā efekta laikā — 7. un 14. dienā pēc dozēšanas	— pirms pirmās iedarbības — pēc tam reizi nedēļā	— pirms pirmās iedarbības — vienreiz iedarbības pirmās vai otrās nedēļas laikā — pēc tam reizi mēnesī	— pirms pirmās iedarbības — vienreiz iedarbības pirmā mēneša laikā — pēc tam reizi trijos mēnešos
	Funkcionalitātes testi	— pirms pirmās iedarbības — 8 stundu laikā pēc dozēšanas aplēstajā maksimālā efekta laikā — 7. un 14. dienā pēc dozēšanas	— pirms pirmās iedarbības — vielas saņemšanas ceturtās nedēļas laikā iespējami tuvu iedarbības laika posma beigām	— pirms pirmās iedarbības — vienreiz iedarbības pirmās vai otrās nedēļas laikā — pēc tam reizi mēnesī	— pirms pirmās iedarbības — vienreiz iedarbības pirmā mēneša laikā — pēc tam reizi trijos mēnešos

▼B

B.44. **ABSORBCIJA ĀDĀ: *IN VIVO* METODE**

1. **METODE**

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO TG 427 (2004) metodei.

1.1. IEVADS

Daudzu ķīmisko vielu iedarbība notiek, uzsūcoties galvenokārt caur ādu, tomēr toksikoloģijas pētījumos ar laboratorijas dzīvniekiem tās ievada orāli. Perkutānās absorbcijas *in vivo* izmēģinājumā saskaņā ar šiem norādījumiem nodrošina sakarību, kas nepieciešama to rezultātu ekstrapolācijai, kas iegūti izmēģinājumos, ievadot orāli, lai novērtētu vielas drošumu, tai nokļūstot uz ādas.

Vielai jāiziet cauri daudziem ādas šūnu slāņiem, tikai pēc tam tā sasniedz asinsriti. Lielākajai daļai vielu uzsūkšanās ātrumu nosaka *stratum corneum*, kas sastāv no nedzīvām šūnām. Ādas caurlaidība ir atkarīga gan no ķīmiskās vielas lipofilajām īpašībām un ārējā epidermas slāņa biezuma, gan no tādiem faktoriem kā vielas molekulmasa un tās koncentrācija. Parasti žurku un trušu ādai ir lielāka caurlaidība salīdzinājumā ar cilvēka ādu, bet jūrascūciņu un pērtiķu āda ir vairāk līdzīga cilvēka ādai.

Perkutānās absorbcijas noteikšanas metodes var iedalīt divās grupās: izmēģinājumi *in vivo* un *in vitro*. Pēc *in vivo* metodēm var iegūt ticamu informāciju par absorbciju caur dažādu laboratorijas dzīvnieku sugu ādu. Par tām jaunākas ir *in vitro* metodes. Pēc šīm metodēm nosaka vielas pārnesi caur pilna vai daļēja biezuma dzīvnieka vai cilvēka ādu uz šķidruma savācēju. *In vitro* metode ir aprakstīta kā atsevišķa testēšanas metode (1). Izvēloties metodi, kas būtu konkrētajai situācijai piemērotākā, ieteicams izmantot ESAO Norādījumus par izmēģinājumu veikšanu vielu absorbcijas ādā noteikšanai (2), jo šajā dokumentā ir sīkāka informācija par *in vivo* un *in vitro* metožu piemērotību.

Pēc šeit aprakstītās *in vivo* metodes iespējams noteikt testējamās vielas penetrāciju caur ādu uz testa sistēmas savācēju. Metodika tika plaši izmantota daudzus gadus (3) (4) (5) (6) (7). Kaut gan perkutānās absorbcijas *in vitro* izmēģinājumus var izmantot daudzos gadījumos, tomēr iespējamas arī situācijas, kurās nepieciešamo informāciju var iegūt tikai izmēģinājumos *in vivo*.

Šīs *in vivo* metodes priekšrocība ir tāda, ka izmanto fizioloģiski un metaboliski neskartu sistēmu, izmēģinājumus veic ar tādu sugu dzīvniekiem, kuras izmanto daudzos toksicitātes pētījumos, un to var pielāgot citu sugu izmantošanai. Metodes trūkumi ir dzīvu dzīvnieku izmantošana, nepieciešamība izmantot ar radioizotopiem iezīmētus materiālus ticamu rezultātu iegūšanai, grūtības noteikt absorbcijas sākumu, kā arī izmēģinājumos visvairāk izmantojamās sugas dzīvnieku (žurkas) un cilvēka ādas caurlaidības atšķirības. Dzīvnieka ādai parasti ir lielāka caurlaidība, tāpēc tādā veidā noteikta cilvēka ādas perkutānā absorbcija var tikt novērtēta par augstu (6) (8) (9). Kodīgu/erozīvu vielu testēšanu nedrīkst veikt izmēģinājumos ar dzīviem dzīvniekiem.

▼B

1.2. DEFINĪCIJAS

Neabsorbētā deva: vielas daudzums, kas nomazgāts no ādas virsmas pēc ekspozīcijas, vielas daudzums uz neokluzīvā pārklājuma, kā arī daudzums, kas, kā pierāda mērījumi, iztvaiko no ādas ekspozīcijas laikā.

Absorbētā deva (*in vivo*): vielas kopējais daudzums dzīvnieka urīnā, būra mazgājamā ūdenī, ekskrementos, izelpotajā gaisā (ja to mēra), asinīs, audos (ja tos ievāc) un ķermenī pēc aplicēšanas vietas ādas noņemšanas.

Absorbējamā deva: vielas daudzums, kas paliek uz ādas vai ādā pēc nomazgāšanas.

1.3. TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

Testējamo vielu, ko vēlams iezīmēt ar radioizotopiem, aplicē uz dzīvnieku ādas, no kuras nocirpta spalva, vienā vai vairākos atbilstošos devu līmeņos veidā, kas ir "lietošanā esošam" preparātam reprezentatīvs. Testējamo preparātu noteiktu laika periodu iztur kontaktā ar ādu ar piemērotu pārklājumu (neokluzīvs, pusokluzīvs vai okluzīvs), lai nepieļautu tā nolaizīšanu. Beidzoties ekspozīcijas laikam, pārklājumu noņem un ādu notīra ar piemērotu tīrāmo vielu, bet pārklājumu un tīrāmos materiālus saglabā analīzei un uzliek jaunu pārklājumu. Pirms ekspozīcijas, tās laikā un pēc tam dzīvniekus tur individuālos metabolisma pētīšanas būros, un šajos termiņos analīzēm ņem ekskrementu un izelpotā gaisa paraugus. Izelpotā gaisa paraugus var neņemt, ja ir pietiekama informācija, ka veidojas maz radioaktīvā metabolīta vai tas neveidojas vispār. Katrā eksperimentā parasti jāizmanto vairākas dzīvnieku grupas, kuras pakļauj testējamā preparāta iedarbībai. Vienas grupas dzīvniekus pēc vielas ekspozīcijas nogalina. Pārējo grupu dzīvniekus nogalina noteiktos termiņos pēc tam (2). Beidzoties paraugu ņemšanas laikam, nogalina pārējos dzīvniekus, ņem asinis analīzēm, atdala aplicēšanas vietu analīzēm un analizē ķermeni, lai noteiktu neizdalītā materiāla daudzumu. Paraugus analizē ar piemērotiem līdzekļiem un nosaka perkutānās absorbcijas līmeni (6) (8) (9).

1.4. METODES APRAKSTS

1.4.1. **Dzīvnieku sugas izvēle**

Žurkas ir visplašāk izmantojamā suga, bet var izmantot arī līnijas un sugas, kurām nav apmatojuma, jo to absorbcijas raksturlielumi ir līdzīgāki cilvēka ādai (3) (6) (7) (8) (9). Jāizmanto jauni pieauguši veselīgi viena dzimuma (parasti vīrišķā) dzīvnieki no parasti izmantojamām laboratorijas līnijām. Uzsākot eksperimentu, atsevišķo dzīvnieku ķermeņa masai jābūt ± 20 % no vidējās masas. Piemēram, var izmantot vīrišķā dzimuma žurkas, kuru ķermeņa masa ir 200–250 g, it sevišķi šā diapazona augšgalā.

▼B

1.4.2. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katra testējamā preparāta testēšanai vienam paraugu ņemšanas termiņam, kurā dzīvniekus nogalina, jāizmanto vismaz četru viena dzimuma dzīvnieku grupa. Katras grupas dzīvniekus nogalina pēc cita laika intervāla, piemēram, ekspozīcijas perioda beigās (parasti pēc 6 vai 24 stundām) un vēlāk (piemēram, pēc 48 un 72 stundām). Ja ir informācija, kas liecina par toksicitātes būtiskām atšķirībām vīrišķā un sievišķā dzimuma īpatņu starpā, jāizvēlas jutīgākais dzimums. Ja šādas informācijas nav, izmēģinājumiem var izmantot jebkura viena dzimuma dzīvniekus.

1.4.3. **Turēšanas un barošanas apstākļi**

Gaisa temperatūrai telpās, kurās tur izmēģinājuma dzīvniekus, jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan gaisa relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, ieteicams, ne vairāk kā 70 %, izņemot uzkopšanas laiku, relatīvā mitruma mērķa vērtība ir 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas dzīvnieku barību, tai un dzeramajam ūdenim bez ierobežojumiem jābūt brīvi pieejamai. Izmēģinājuma laikā un, vēlams, arī aklimatizācijas laikā dzīvniekus tur atsevišķos, metabolisma pētīšanai paredzētos būros. Barības izmētāšana un ūdens izliešana ietekmē izmēģinājuma rezultātus, tāpēc tā iespējami jānovērš.

1.4.4. **Dzīvnieku sagatavošana**

Dzīvniekus marķē, lai nodrošinātu to identifikāciju, un aklimatizācijai laboratorijas apstākļiem tur būros vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma sākšanas.

Pēc aklimatizācijas perioda un aptuveni 24 stundas pirms devas aplicēšanas katram dzīvniekam ķermeņa plecu un muguras daļā jābūt nocirptam apmatojumam. Bojātas ādas caurlaidības īpašības atšķiras no nebojātas ādas īpašībām, tāpēc jāuzmanās, lai ādu nenobrāztu. Pēc cirpšanas un aptuveni 24 stundas pirms testējamās vielas aplicēšanas (skatīt 1.4.7. punktu) ādas virsma jānoslauka ar acetonu, lai noņemtu tauku dziedzeru izdalījumus. Papildu mazgāšana ar ziepēm un ūdeni nav ieteicama, jo ziepju paliekas var veicināt testējamās vielas absorbciju. Vietai jābūt pietiekami lielai, lai iegūtu ticamus rezultātus, aprēķinot absorbēto testējamās vielas daudzumu uz 1 cm^2 ādas, ieteicamā platība ir vismaz 10 cm^2. Šāda platība ir iespējama, ja izmanto žurkas ar ķermeņa masu 200–250 g. Pēc sagatavošanas dzīvniekus atkal ievieto metabolisma pētīšanas būros.

1.4.5. **Testējamā viela**

Testējamā viela ir materiāls, kura penetrācijas raksturlielumi jāizpēta. Ideālā gadījumā testējamajai vielai jābūt iezīmētai ar radioizotopiem.

1.4.6. **Testējamās vielas sagatavošana**

Testējamās vielas preparātam (piemēram, tīram, atšķaidītam vai salikta sastāva materiālam, kas satur testējamo vielu un tiek aplicēts uz ādas) jābūt tam pašam (vai faktiski tādam pašam), kura iedarbībai var tikt pakļauti cilvēki vai, iespējams, citas mērķa sugas. Jebkādas atkāpes no izmantojamā "lietošanā esošā" preparāta jāpamato. Ja vajadzīgs, testējamo vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Ja izmanto nevis ūdeni, bet citus nesējus, jābūt zināmiem to uzsūkšanās raksturlielumiem un datiem par iespējamo savstarpējo iedarbību ar testējamo vielu.

▼B

1.4.7. **Aplicēšana uz ādas**

Uz ādas virsmas izvēlas attiecīgas platības aplicēšanas vietu. Zināmu testējamā preparāta daudzumu vienmērīgi uzklāj attiecīgajā vietā. Šim daudzumam jāatveido potenciālais cilvēka lietojamais daudzums, parasti 1–5 mg/cm^2 cietai vielai vai līdz 10 µl/cm^2 šķidrumiem. Jebkāds cits daudzums jāpamato ar sagaidāmiem lietošanas apstākļiem, eksperimenta mērķiem vai testējamā preparāta fizikālajām īpašībām. Pēc vielas aplicēšanas apstrādātā vieta jāaizsargā pret nolaizīšanu. Tipisks līdzeklis ir parādīts 1. attēlā. Parasti aplicēšanas vietu aizsargā ar neokluzīvu pārklājumu (piemēram, ar gaisu caurlaidīgu pārklājumu no neilona sietiņa). Tomēr ilgstošas aplicēšanas gadījumā aplicēšanas vieta jāaizsargā ar okluzīvu līdzekli. Ja daļēji gaistošas testējamās vielas iztvaikošanas rezultātā testējamās vielas atgūstamība samazinās zemāk par pieņemamo līmeni (skatīt arī 1.4.10. punkta pirmo daļu), iztvaikojusī viela jāuztver ar ogles filtru uz aplicēšanas ierīces (skatīt 1. attēlu). Svarīgi, lai šīs ierīces nebojātu ādu, neabsorbētu testējamo preparātu un ar to nereaģētu. Dzīvniekus atkal ieliek individuālajos metabolisma pētīšanas būros, lai savāktu ekskrētus.

1.4.8. **Ekspozīcijas ilgums un paraugu ņemšana**

Ekspozīcijas ilgums ir laika periods starp aplicēšanu un testējamā preparāta noņemšanu, skalojot ādu. Jāpielieto attiecīgais ekspozīcijas periods (parasti 6 vai 24 stundas), pamatojoties uz sagaidāmo ekspozīcijas ilgumu cilvēkam. Pēc ekspozīcijas laika beigām dzīvniekus tur metabolisma būros līdz noteiktajam paraugu ņemšanas termiņam, kad tos nogalina. Dzīvnieki jānovēro, lai konstatētu toksicitātes/uzvedības anomāliju pazīmes regulāros intervālos visā izmēģinājuma laikā. Ekspozīcijas perioda beigās apstrādātā āda jānovēro, vai nav redzamu kairinājuma pazīmju.

Metabolisma pētīšanas būriem jābūt tādiem, lai varētu atsevišķi savākt urīnu un ekskrementus visā eksperimenta laikā. Būru konstrukcijai jānodrošina iespējas uztvert ar ^{14}C izotopu iezīmētu oglekļa dioksīdu un ^{14}C gaistošos oglekļa savienojumus, kuri jāanalizē, ja tie veidojas zināmā daudzumā (> 5 %). Urīns, ekskrementi un uztveramās vielas (piemēram, ar ^{14}C izotopu iezīmēts oglekļa dioksīds un ^{14}C gaistošie oglekļa savienojumi) jāsavāc atsevišķi no katras grupas katrā paraugu ņemšanas reizē. Ja ir pietiekama informācija par to, ka radioaktīvais metabolīts veidojas maz vai neveidojas vispār, tad var izmantot vaļējus būrus.

Ekskrētus savāc ekspozīcijas laikā pēc 24 stundām no sākotnējā kontakta ar ādu un pēc tam katru dienu līdz izmēģinājuma beigām. Parasti pietiek ar trijiem ekskrētu savākšanas intervāliem, tomēr, ņemot vērā paredzēto testējamā preparāta lietojumu vai esošos datus par kinētiku, eksperimentam var noteikt piemērotākos vai papildu laika intervālus.

Ekspozīcijas laika beigās aizsargpārklājumu no dzīvnieka noņem un katru atsevišķi glabā analīzei. Visu dzīvnieku apstrādātā āda jānoskalo vismaz trīs reizes ar tīrāmo līdzekli un piemērotiem tamponiem. Jāievēro piesardzība, lai neaiztiktu pārējās ķermeņa daļas. Tīrīšanas līdzeklim jāatbilst parastai higiēnas praksei, piemēram, jāizmanto ziepju ūdens šķīdums. Beigās āda jānosusina. Visi tamponi un nomazgājumi jāsaglabā analīzei. Pirms dzīvnieka novietošanas atpakaļ būrī uz ādas jāuzliek jauns pārklājums, lai aizsargātu to dzīvnieku apstrādātās vietas, kuri ir iekļauti vēlāku termiņu grupās.

▼B

1.4.9. **Beigu procedūras**

Pēc noteikta termiņa attiecīgās grupas dzīvnieki jānogalina un jāņem asinis analīzei. Aizsargpārklājums jānoņem analīzei. Āda no aplicēšanas vietas un tai piegulošajām neapstrādātajām apcirptajām vietām jānoņem no katra dzīvnieka atsevišķai analīzei. Aplicēšanas vieta jāfrakcionē, atdalot *stratum corneum* no zem tā esošās epidermas, lai iegūtu vairāk informācijas par testējamās vielas uzsūkšanos. Nosakot uzsūkšanos laikā pēc ekspozīcijas perioda, var iegūt zināmus norādījumus par to, kas notiek ar testējamo vielu, tai nokļūstot *stratum corneum*. Lai vienkāršotu ādas frakcionēšanu (pēc pēdējās ādas mazgāšanas un dzīvnieka nogalināšanas), jānoņem visi aizsargpārklājumi. Ādu no aplicēšanas vietas kopā ar tai piegulošās ādas gredzenu izgriež no žurkas ķermeņa un piestiprina uz plāksnītes. Uz ādas virsmas piestiprina līmlentes strēmelīti, viegli piespiežot, un līmlenti noņem kopā ar *stratum corneum* daļu. Šo operāciju atkārto, kamēr strēmelīte vairs nelīp pie ādas virsmas un viss *stratum corneum* ir noņemts. Atsevišķajam dzīvniekam izmantotās lentes strēmelītes var apvienot vienā traukā ar līdzekli audu mineralizācijai, lai izšķīdinātu *stratum corneum*. Visus iespējamos mērķa audus var atdalīt atsevišķai analīzei pirms pārējā ķermeņa analīzes, lai noteiktu ķermenī absorbēto devu. Atsevišķo dzīvnieku ķermeņi jāsaglabā analīzei. Parasti veic tikai kopējā satura analīzi. Mērķa orgānus var izņemt atsevišķai analīzei (ja par šādu nepieciešamību liecina citi pētījumi). Urīns, kas atrodas urīnpūslī noteiktajā paraugu ņemšanas laikā, kad dzīvnieku nogalina, jāpievieno iepriekš savāktajam urīnam. Pēc ekskrētu savākšanas metabolisma būris, būri un to uztvērēji pēc paraugu ņemšanas termiņa, kad dzīvniekus nogalina, jāmazgā ar piemērotu šķīdinātāju. Līdzīgā veidā jāizanalizē citas iespējami piesārņotas ierīces.

1.4.10. **Analīze**

Visos eksperimentos jāpanāk adekvāta atgūstamība (t. i., vidēji 100 ± 10 % no radioaktivitātes). Atgūstamība, kas ir ārpus šā diapazona, ir jāizskaidro. Lietotās devas daudzuma analīze katrā paraugā jāveic pēc attiecīgi validētām procedūrām.

Statistikas rādītājos jāiekļauj visu aplikāciju atsevišķo atkārtojumu rezultātu izkliede.

2. **DATI**

Visiem dzīvniekiem un katram paraugu ņemšanas laikam jāveic šādi testējamās vielas un/vai metabolītu mērījumi. Šiem individuālajiem datiem papildus jāsniedz apkopoti dati vidējo vērtību veidā pa paraugu ņemšanas laikiem:

— daudzums, kas saistīts ar aizsargpārklājuma ierīcēm,

— daudzums, kuru var noņemt no ādas,

— daudzums uz ādas/ādā, kuru nevar nomazgāt no ādas,

▼B

— daudzums asinīs,

— daudzums ekskrementos un izelpotajā gaisā (ja vajadzīgs),

— ķermenī un atsevišķām analīzēm izņemtajos orgānos palikušais daudzums.

Testējamās vielas un/vai metabolīta daudzums ekskrētos, izelpotajā gaisā, asinīs un ķermenī ļauj noteikt kopējo daudzumu, kas tika absorbēts katrā laika periodā. Var aprēķināt arī testējamās vielas daudzumu, kuru absorbē 1 cm^2 ādas, kas tika pakļauta testējamās vielas iedarbībai ekspozīcijas laikā.

3. **ZIŅOJUMS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj protokolā noteiktās prasības, ieskaitot izmantotās testēšanas sistēmas pamatojumu, un jānorāda turpmāk minētais.

Testējamā viela:

— identifikācijas dati (piemēram, *CAS* Nr., ja ir; avots; tīrības pakāpe (radioķīmiskā tīrība); zināmie piemaisījumi; ražošanas partijas numurs),

— fizikālais stāvoklis, fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, pH, gaistamība, šķīdība, stabilitāte, molekulmasa un log P_{ow}).

Testējamais preparāts:

— sastāvs un izmantošanas pamatojums,

— sīkāka informācija par testējamo preparātu, lietoto daudzumu, sasniegto koncentrāciju, nesēju, stabilitāti un homogenitāti.

Izmēģinājuma dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— dzīvnieku izcelsmes avots, turēšanas apstākļi, barošana u. c.,

— katra dzīvnieka ķermeņa masa testēšanas sākumā.

Testa apstākļi:

— informācija par testējamā preparāta lietošanu (aplicēšanas vieta, noteikšanas metodes, (ar oklūziju/bez oklūzijas, apjoms, ekstrakcija, detektēšana),

— barības un ūdens kvalitātes dati.

Rezultāti

— toksicitātes pazīmes,

— tabulā apkopoti dati par absorbciju (izsakot kā ātrumu, daudzumu vai daļu procentos),

▼B

— kopējā atgūstamība eksperimentā,

— rezultātu interpretācija, salīdzinājums ar citiem datiem par testējamā savienojuma perkutānu absorbciju.

Rezultātu novērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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), p. 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.

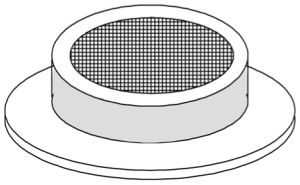
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369–373.

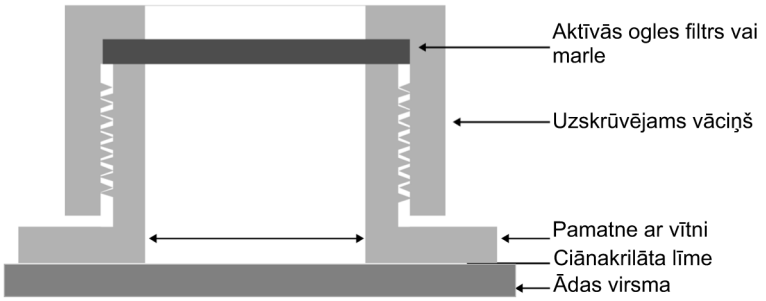
(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, p. 399–404.

▼B

1. attēls

Parasti izmantotās ierīces konstrukcija aplicēšanas vietas aprobežošanai un aizsardzībai perkutānas absorbcijas *in vivo* izmēģinājumos





▼B

B.45. **ABSORBCIJA ĀDĀ: *IN VITRO* METODE**

1. **METODE**

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO TG 428 (2004) metodei.

1.1. IEVADS

Šī metode paredzēta informācijas iegūšanai par testējamās vielas absorbciju, to aplicējot uz izgrieztas ādas. Šo metodi var izmantot atsevišķi vai kopā ar *in vivo* testēšanas metodi (1). Plānojot eksperimentus, kurā tiek izmatota šī metode, ieteicams izmantot ESAO Norādījumus par izmēģinājumu veikšanu vielu absorbcijas ādā noteikšanai (2). Norādījumu dokuments sagatavots, lai atvieglotu konkrētiem apstākļiem piemērotāko *in vitro* procedūru izvēli un nodrošinātu ticamu rezultātu iegūšanu ar šo metodi.

Absorbcijas ādā un iedarbības caur ādu noteikšanai izmantojamās metodes iedalāmas divās grupās – *in vivo* un *in vitro* metodes. *In vivo* metodes absorbcijas ādā noteikšanai tiek plaši pielietotas un sniedz farmakokinētisko informāciju par vairākām dzīvnieku sugām. *In vivo* metode ir aprakstīta atsevišķi (1). Arī *in vitro* metodes daudzus gadus tika pielietotas absorbcijas ādā noteikšanai. Kaut gan šajā testēšanas metodē minēto *in vitro* metožu formālās validācijas pētījumi netika veikti, ESAO eksperti 1999. gadā ir vienojušies, ka par *in vitro* metodēm ir pietiekami daudz izvērtētas informācijas, kas tās apstiprina (3). Sīkāka informācija par to, ieskaitot daudzos *in vitro* un *in vivo* metožu tiešos salīdzinājumus, ir minēta Norādījumu dokumentā (2). Šis temats apskatīts vairākās monogrāfijās, kurās labi pamatota *in vitro* metodes izmantošana (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Pēc *in vitro* metodēm nosaka ķīmiskās vielas difūziju ādā un cauri ādai uz šķīduma savācēju, izmantojot nedzīvu ādu, lai mērītu tikai difūziju, vai svaigus, metaboliski aktīvus ādas audus, lai vienlaicīgi mērītu difūziju un ādas metabolismu. Šīs metodes izmanto, lai salīdzinātu dažāda sastāva preparātu ķīmisko vielu iedarbību uz ādu un caur to un lai iegūtu datus, kas izmantojami perkutānās absorbcijas modelēšanai cilvēka organismā.

Iespējams, ka *in vitro* metode nav pielietojama visās situācijās un visām ķīmisko vielu klasēm. *In vitro* testēšanas metodi varētu pielietot, lai veiktu penetrācijas ādā sākotnējo kvalitatīvo novērtēšanu. Noteiktos gadījumos var rasties nepieciešamība pielietot to *in vivo* datiem. Par situācijām, kādās varētu būt piemērotāka *in vitro* metode, norādījumus skatīt dokumentā (2). Pieņemot lēmumu, var izmantot sīkāku papildu informāciju, kas minēta (3).

Šī metode nosaka vispārējos principus absorbcijas ādā un testējamās vielas pārvietošanās noteikšanai izgrieztā ādā. Var izmantot daudzu zīdītāju, arī cilvēka, ādu. Ādas caurlaidības īpašības saglabājas pēc izgriešanas no ķermeņa, jo galvenā difūzijas barjera ir nedzīvs *stratum corneum*; aktīva ķīmisko vielu pārnese caur ādu nav konstatēta. Tika pierādīts, ka āda spēj metabolizēt dažas ķīmiskās vielas perkutānās absorbcijas laikā (6), bet šis process nav ātrumu ierobežojošs, ņemot vērā faktisko absorbēto devu, kaut gan var ietekmēt iedarbības īpašības, vielai nokļūstot asinsritē.

▼B

1.2 DEFINĪCIJAS

Neabsorbētā deva: vielas daudzums, kas nomazgāts no ādas virsmas pēc ekspozīcijas, vielas daudzums uz neokluzīvā pārklājuma, kā arī daudzums, kas, kā pierāda mērījumi, iztvaiko no ādas ekspozīcijas laikā.

Absorbētā deva (*in vitro*): vielas kopējais daudzums, kas noteiktā laikā nonāk šķīduma uztvērējā vai cirkulācijas sistēmā.

Absorbējamā deva: vielas daudzums, kas paliek uz ādas vai ādā pēc nomazgāšanas.

1.3. METODES PRINCIPS

Testējamo vielu, kas var būt iezīmēta ar radioizotopiem, aplicē uz ādas parauga virsmas, ar kuru nodala divas difūzijas šūnas kameras. Viela noteiktu laiku noteiktos apstākļos atrodas uz ādas, pēc tam vielu noņem ar piemērotām tīrīšanas procedūrām. Paraugus no šķīduma uztvērēja ņem noteiktos laika intervālos eksperimenta gaitā un analizē, nosakot testējamo vielu un/vai metabolītus.

Ja tiek izmantotas metaboliski aktīvas sistēmas, testējamās vielas metabolītus var analizēt ar piemērotām metodēm. Eksperimenta beigās attiecīgos gadījumos testējamās vielas un tās metabolītu sadalījumu nosaka kvantitatīvi.

Šajā metodē un norādījumu dokumentā (2) aprakstītajos apstākļos nosaka testējamās vielas absorbciju noteiktā laikā, analizējot šķīdumu uztvērējā un apstrādāto ādu. Uz ādas palikusī testējamā viela jāuzskata par absorbētu, izņemot gadījumus, kad var pierādīt, ka absorbciju var noteikt, tikai analizējot šķīdumu uztvērējā. Pārējo daļu (no ādas noskalotā un ādas slāņos palikušā materiāla) analīze ļauj veikt turpmāko datu novērtēšanu, ieskaitot kopējo testējamās vielas pārvietošanos un atgūstamību.

Lai kontrolētu testēšanas sistēmas darbību un attiecīgajā laboratorijā iegūto rezultātu ticamību, jāizmanto standartvielas, ar kurām iegūtie rezultāti atbilst par attiecīgo metodi publicētajiem datiem. Šo prasību var izpildīt, attiecīgo standartvielu (ieteicams, lai tai būtu testējamajai vielai līdzīgas lipofilās īpašības) testējot paralēli ar testējamo vielu, vai sniedzot adekvātus iepriekšējos vēsturiskos datus par vairākām standartvielām ar dažādām lipofilajām īpašībām (piemēram, kofeīnu, benzoskābi un testosteronu).

1.4. TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

1.4.1. **Difūzijas šūna**

Difūzijas šūna sastāv no donorkameras un receptorkameras, to starpā novieto ādu (tipiskas konstrukcijas piemērs parādīts 1. attēlā). Šūnai labi jāpieguļ ādai, paraugu ņemšanai jābūt vienkāršai, ar labu uztvērēja šķīduma, kas kontaktē ar ādas apakšpusi, maisīšanu un ar šūnas un tās satura temperatūras regulāciju. Var izmantot gan statiskās, gan caurplūdes difūzijas šūnas. Parasti donorkamera ekspozīcijas laikā paliek nenoslēgta, ja lieto fiksētu testējamā preparāta devu. Tomēr dažiem nefiksētas aplicēšanas vai fiksēto devu testēšanas scenārijiem donorkamera var būt slēgta.

▼B

1.4.2. **Uztvērēja šķīdums**

Jādod priekšroka fizioloģiskam uztvērēja šķīdumam ar vadītspēju, kaut gan var lietot arī citādu, ja tas ir pamatoti. Jānosaka precīzs uztvērēja šķīduma sastāvs. Jāpārliecinās, ka testējamajai vielai ir pietiekama šķīdība uztvērēja šķīdumā un ka šis šķīdums nedarbojas kā absorbcijas barjera. Bez tam uztvērēja šķīdums nedrīkst ietekmēt ādas parauga integritāti. Izmantojot caurplūdes sistēmu, caurplūdes ātrums nedrīkst kavēt testējamās vielas difūziju uztvērēja šķīdumā. Izmantojot statiskās difūzijas šūnu, šķīdums pastāvīgi jāmaisa un regulāri jāņem paraugi. Ja pēta metabolismu, uztvērēja šķīdumam eksperimenta laikā jāuztur ādas dzīvotspēja.

1.4.3. **Ādas preparāti**

Var izmantot cilvēka vai dzīvnieku ādu. Vispāratzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst valsts un starptautiskajām ētikas normām un noteikumiem. Kaut gan priekšroka jādod dzīvotspējīgai ādai, var izmantot arī nedzīvu ādu ar nosacījumu, ka var pierādīt ādas integritāti. Var izmantot epidermas membrānas (atdalot enzimātiski, termiski vai ķīmiski) vai slāņos sadalītu (parasti 200–400 μm biezu) ādu, kas sagatavota ar dermatomu. Var izmantot arī pilna biezuma ādu, bet tai nevajadzētu būt pārlieku biezai (> 1 mm), ja tas nav īpaši nepieciešams testējamās vielas noteikšanai ādas slāņos. Sugas, anatomiskās vietas un sagatavošanas veids jāpamato. Par katru testējamo preparātu jāiegūst pieņemami dati vismaz četros atkārtojumos.

1.4.4. **Ādas preparāta integritāte**

Ļoti svarīga ir pareiza ādas sagatavošana. Nepareizi rīkojoties, var rasties *stratum corneum* bojājums, tāpēc sagatavotā ādas parauga integritāte ir jāpārbauda. Ja pēta ādas metabolismu, jāizmanto svaigi izgriezta āda, ciktāl tas iespējams, un testēšana jāveic apstākļos, par kuriem zināms, ka tajos notiek metaboliska aktivitāte. Vispārīgs norādījums ir tāds, ka svaigi izgriezta āda jāizmanto 24 stundu laikā, bet ādas glabāšanas ilgums var būt atšķirīgs atkarībā no metabolizācijā iesaistītās enzīmu sistēmas un glabāšanas temperatūras (13). Ja ādas preparāti tika uzglabāti pirms izmantošanas, jāiegūst liecības par barjeras funkcijas saglabāšanos.

1.4.5. **Testējamā viela**

Testējamā viela ir materiāls, kuram jānosaka penetrācijas raksturlielumi. Ideālā gadījumā testējamajai vielai vajadzētu būt iezīmētai ar radioizotopiem.

1.4.6 **Testējamais preparāts**

Testējamās vielas preparātam (piemēram, tīram, atšķaidītam vai salikta sastāva materiālam, kas satur testējamo vielu un tiek aplicēts uz ādas) jābūt tam pašam (vai faktiski tādam pašam), kura iedarbībai var tikt pakļauti cilvēki vai, iespējams, citas mērķa sugas. Jebkādas atkāpes no izmantojamā "lietošanā esošā" preparāta jāpamato.

▼B

1.4.7. **Testējamo vielu koncentrācijas un sastāvs**

Parasti izmēģinājumus veic ar vairākām testējamās vielas koncentrācijām, sasniedzot lielāko no potenciālajām koncentrācijām, kuru iedarbībai var tikt pakļauti cilvēki. Līdzīgā veidā jānosaka tipisko sastāvu testēšanas diapazons.

1.4.8. **Aplicēšana uz ādas**

Parastos apstākļos cilvēks var tikt pakļauts fiksētu ķīmisko vielu devu iedarbībai. Tāpēc jāizmanto devas, kas atbilst iespējamajai iedarbībai uz cilvēku, parasti 1–5 mg/cm^2 ādas cietām vielām un līdz 10 µl/cm^2 šķīdumiem. Daudzums jāpamato ar sagaidāmiem lietošanas apstākļiem, pētījumu mērķiem vai testējamā preparāta fizikālajiem raksturlielumiem. Piemēram, aplicēšana uz ādas virsmas varētu būt nedozēta, ja tiek aplicēti lieli apjomi uz virsmas vienību.

1.4.9. **Temperatūra**

Ķīmisko vielu pasīvo difūziju (un tātad to absorbciju ādā) ietekmē temperatūra. Difūzijas kamerā un ādā jāuztur pastāvīga temperatūra, kas ir tuva normālai ādas temperatūrai 32 ±1 °C. Dažādām testēšanas šūnu konstrukcijām vajadzīga atšķirīga ūdens vannas vai sildīšanas bloka temperatūra, lai nodrošinātu, ka tā uztvērējā/ādā atbilst fizioloģiskajai normai. Relatīvajam mitrumam jābūt no 30 līdz 70 %.

1.4.10. **Ekspozīcijas ilgums un paraugu ņemšana**

Testējamā preparāta iedarbība uz ādu var ilgt visu izmēģinājuma laiku vai īsāku termiņu (piemēram, modelējot īpašu iedarbības veidu uz cilvēka organismu). No ādas jānomazgā liekais testējamais preparāts, izmantojot piemērotu tīrīšanas līdzekli, un noskalojumi jāsavāc analīzei. Testējamā preparāta nomazgāšanas procedūra ir atkarīga no paredzētajā lietojumā esošajiem izmantošanas apstākļiem, un tā jāpamato. Parasti paraugi jāņem pēc 24 stundām, lai nodrošinātu adekvātus absorbcijas gaitas novērojumus. Pēc 24 stundām ādas integritāte var sākt pasliktināties, tāpēc paraugu ņemšanas laiks parasti nedrīkst būt ilgāks par 24 stundām. Ja testējamā viela ātri iesūcas ādā, varētu būt, ka tas nav nepieciešams, bet ja testējamā viela ādā iesūcas lēni, varētu būt vajadzīgs ilgāks laiks. Paraugu ņemšanas biežumam no uztvērēja šķīduma jānodrošina datu iegūšana testējamās vielas absorbcijas gaitas attēlošanai grafiski.

1.4.11. **Beigu procedūras**

Visas testējamās sistēmas sastāvdaļas jāanalizē, un jānosaka atgūstamība. Minētais attiecas uz donorkameru, mazgāšanas šķīdumu pēc ādas skalošanas, ādas preparātu un uztvērēja šķīdumu/kameru. Zināmos gadījumos ādu varētu sadalīt un iegūt eksponēto ādas vietu, ādas daļu zem difūzijas šūnas malām un *stratum corneum*, ko izmanto epidermas un dermas frakcijas atsevišķām analīzēm.

1.4.12. **Analīze**

Visos izmēģinājumos jāpanāk adekvāta atgūstamība (mērķa vērtība vidēji 100 ±10 % no radioaktivitātes, iespējamās novirzes pamatojot). Testējamās vielas daudzums uztvērēja šķīdumā, ādas preparātā, uz ādas virsmas un aparatūras skalošanas šķīdumā jāanalizē pēc attiecīgi piemērotas metodes.

▼B

2. **DATI**

Jānorāda uztvērēja šķīduma sastāva izmaiņas, testējamās ķīmiskās vielas sadalījums testēšanas sistēmā un absorbcijas gaita atkarībā no laika. Ja ekspozīcijai pielieto fiksētas devas, jāaprēķina no ādas noskalotais, ar ādu saistītais (kā arī dažādos ādas slāņos esošais daudzums, ja to analizē) un uztvērēja šķīdumā esošais daudzums (ātrums un daudzums vai aplicētās devas daļa procentos). Dažkārt absorbciju ādā var izteikt tikai ar datiem par uztvērēja šķīdumu. Tomēr, ja testējamā viela paliek ādā izmēģinājuma beigās, tā var būt jāiekļauj kopējā absorbētajā daudzumā (skatīt (3) 66. punktā). Ja ekspozīcijai nelieto fiksētas devas, pēc iegūtajiem datiem var aprēķināt caurlaidības konstanti (Kp). Minētajos apstākļos absorbēto daļu procentos nenosaka.

3. **REZULTĀTI**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj protokolā noteiktās prasības, ieskaitot izmantojamās testēšanas sistēmas pamatojumu, kā arī šāda informācija.

Testējamā viela:

— fizikālais stāvoklis, fizikāli ķīmiskās īpašības (vismaz molekulmasa un log P_{ow}), tīrība (radioķīmiskā tīrība),

— identifikācijas informācija (piemēram, ražošanas partijas numurs),

— šķīdība uztvērēja šķīdumā.

Testējamais preparāts:

— sastāvs un lietošanas pamatojums,

— homogenitāte.

Testēšanas apstākļi:

— ādas avoti un ņemšanas vieta, sagatavošanas metode, glabāšanas apstākļi pirms izmantošanas, pirmapstrāde (tīrīšana, apstrāde ar antibiotikām u. c.), ādas integritātes mērījumi, metaboliskais statuss, lietošanas pamatojums,

— testēšanas šūnas konstrukcija, uztvērēja šķīduma sastāvs, uztvērēja šķīduma caurplūdes ātrums vai paraugu ņemšanas laiki un procedūras,

— informācija par testējamā preparāta aplicēšanu un lietoto devu noteikšanu,

— ekspozīcijas ilgums,

— informācija par testējamā preparāta noņemšanu no ādas, piemēram, par ādas skalošanu,

— informācija par ādas analīzi un visām frakcionēšanas metodēm, kas tika izmantotas, lai noteiktu sadalījumu ādā,

▼B

— testēšanas šūnas un iekārtas skalošanas metodes,

— analīžu metodes, ekstrakcijas paņēmieni, dati par analītisko metožu noteikšanas robežām un validācijas dati.

Rezultāti:

— kopējā atgūstamība eksperimentā (lietotā deva ≡ noskalojumi no ādas + āda + uztvērēja šķīdums + testēšanas šūnas skalošanas šķīdums),

— tabulā apkopoti atsevišķo šūnu atgūstamības dati katrā nodalījumā,

— absorbcijas gaita,

— tabulā apkopoti dati par absorbciju (izsakot kā ātrumu, daudzumu vai daļu procentos).

Rezultātu novērtējums.

Secinājumi.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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 R.L. 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, p. 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

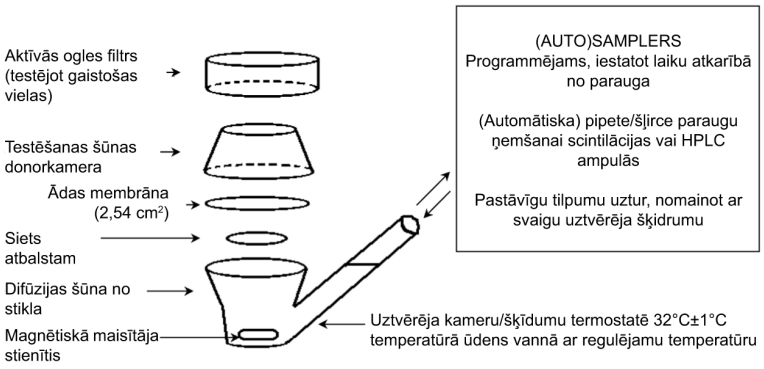
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(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: p. 356–365.

1. attēls

Tipiska statiskās difūzijas šūnas konstrukcija perkutānas absorbcijas in vitro pētījumiem



▼M8

B.46. **ĀDAS KAIRINĀJUMA NOTEIKŠANA AR CILVĒKA EPIDERMAS REKONSTRUKCIJAS MODEĻA *IN VITRO* TESTU**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 439 (2015). Ādas kairinājums ir atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām [atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1])]. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, ko var izmantot kairinošu ķimikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības identificēšanai saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* 2. kategoriju (2). Reģionos, kas nepieņem fakultatīvo ANO *GHS* 3. kategoriju (vāji kairinātāji), šo testēšanas metodi var izmantot arī neklasificētu ķimikāliju identificēšanai. Tāpēc atkarībā no tiesiskā regulējuma un izmantotās klasifikācijas sistēmas šo testēšanas metodi var izmantot, lai noteiktu ķimikāliju spēju izraisīt ādas kairinājumu; to izmanto vai nu kā atsevišķu aizstājējtestu *in vivo* ādas kairinājuma testēšanai, vai kā daļēju aizstājējtestu testēšanas stratēģijas ietvaros (3).

2. Ādas kairinājumu parasti novērtē, izmantojot laboratorijas dzīvniekus [TM B.4, kas ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404, kura sākotnēji pieņemta 1981. gadā un pārstrādāta 1992., 2002. un 2015. gadā] (4). Kodīguma testēšanai ir pieņemtas trīs validētas *in vitro* testēšanas metodes: ES TM B.40 (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 430), TM B.40a (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 431) un TM B.65 (ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 435) (5) (6) (7). *ESAO* norādījumu dokuments par integrētām pieejām testēšanai un novērtēšanai attiecībā uz ādas koroziju un kairinājumu (*IATA*) apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana (3).

3. Šī testēšanas metode pievēršas tādam cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Tās pamatā ir *in vitro* testēšanas sistēma, kurā izmanto cilvēka epidermas rekonstrukcijas modeļus (*RhE*), kuru bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības ir ļoti līdzīgas cilvēka ādas virsējās daļas, t. i., epidermas, īpašībām. Lai rekonstruētu epidermas modeli, kam ir reprezentatīva histoloģija un citoloģiskā arhitektūra, *RhE* testēšanas sistēmā par šūnu avotu izmanto nepārveidotus cilvēka keratinocītus. Ir pieejami veiktspējas standarti (VS), kas atvieglo līdzīgu un modificētu *RhE* testēšanas metožu validēšanu un novērtēšanu saskaņā ar ESAO norādījumu dokumenta Nr. 34 principiem (8) (9). Attiecīgā testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2010. gadā, 2013. gadā atjaunināta, lai tajā iekļautu papildu *RhE* modeļus, un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un ieviestu alternatīvu procedūru, ko izmanto dzīvotspējas mērīšanai.

4. Pirmsvalidēšanas, optimizēšanas un validēšanas pētījumi ir pabeigti attiecībā uz četriem komerciāli pieejamiem *in vitro* testa modeļiem (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), kuru pamatā ir *RhE* testēšanas sistēma (jutība 80 %, specifiskums 70 % un precizitāte 75 %). Minētie četri testa modeļi ir iekļauti šajā TM un norādīti 2.

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

papildinājumā, kurā sniegta arī informācija par tā validēšanas pētījuma veidu, kas izmantots attiecīgo testēšanas metožu validēšanai. Kā norādīts 2. papildinājumā, šīs testēšanas metodes un veiktspējas standartu (8) izstrādē ir izmantota validētā references metode (VRM).

5. ESAO datu savstarpējā atzīšana tiks nodrošināta tikai attiecībā uz testa modeļiem, kas validēti saskaņā ar veiktspējas standartiem (8), ja minētos testa modeļus ESAO ir pārskatījusi un pieņēmusi. Šajā testēšanas metodē iekļautos testa modeļus un attiecīgo ESAO *TG* var bez izšķirības izmantot, lai, turklāt izmantojot datu savstarpējās atzīšanas priekšrocības, izpildītu valstu prasības attiecībā uz testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot *in vitro* testēšanas metodes ādas kairinājuma noteikšanai.

6. Šajā dokumentā izmantoto terminu definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. Kā liecina pilnīgais provizoriskās validācijas pētījums, kurā novērtētas un raksturotas *RhE* testēšanas metodes (16), minētās testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka tā nenodrošina iespēju ķimikālijas klasificēt fakultatīvajā ANO *GHS* 3. kategorijā (vāji kairinātāji) (1). Tāpēc šīs testēšanas metodes izmantošanas veids būs atkarīgs no dalībvalstu tiesiskā regulējuma. Kas attiecas uz ES, 3. kategorija *CLP* regulā nav iekļauta. Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (3). Ir atzīts, ka cilvēka ādas izmantošanai jāatbilst nacionālām un starptautiskām ētiskajām normām un nosacījumiem.

8. Šī testēšanas metode pievēršas tādam cilvēka veselības beigupunktam kā ādas kairinājums. Lai gan tā nesniedz pietiekamu informāciju par ādas koroziju, tomēr jānorāda, ka TM B.40a par ādas koroziju (līdzvērtīga ESAO *TG* Nr. 431) pamatojas uz tādu pašu *RhE* testēšanas sistēmu, bet izmanto citu protokolu (6). Šīs testēšanas metodes pamatā ir *RhE* modeļi, kuros izmanto cilvēka keratinocītus un kuri tādējādi *in vitro* pārstāv attiecīgās sugas mērķorgānu. Tā turklāt tiešā veidā aptver iekaisuma kaskādes/mehānisma sākotnējo posmu norisēs (šūnu un audu bojājumi, kuru rezultāts ir lokalizēta trauma), kuras notiek, kairinājumam rodoties *in vivo*. Ar šo testēšanas metodi saistītajā validēšanas procesā ir testēts plašs ķimikāliju spektrs, un validēšanas pētījuma datubāze aptver kopumā 58 ķimikālijas (16)(18)(23). Šī testēšanas metode ir izmantojama cietvielām, šķidrumiem, pussķidrām vielām un vaskiem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietvielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietvielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validācijas pētījumā vēl nav novērtētas gāzes un aerosoli (29). Kaut arī jādomā, ka vispār gāzes un aerosolus ar *RhE* tehnoloģiju testēt ir iespējams, ar pašreizējo testēšanas metodi tos testēt nevar.

9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt. Tomēr maisījumi aptver plašu kategoriju un sastāvu spektru un patlaban par maisījumu testēšanu sevišķi daudz informācijas nav pieejams, tāpēc, ja var pierādīt, ka kādai konkrētai maisījumu kategorijai (piemēram, saskaņā ar stratēģiju, ko piedāvā *Eskes* u. c., 2012. g.) (30) attiecīgā testēšanas metode nav izmantojama, šo testēšanas

▼**M8**

metodi šai konkrētajai maisījumu kategorijai nevajag izmantot. Līdzīga rūpība jāievēro gadījumos, kad ir konstatēta konkrētu ķimikāliju klašu vai fizikālķīmisko īpašību nepiemērotība pašreizējai testēšanas metodei.

10. Testējamās ķimikālijas, kas gaismu absorbē tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns, un testējamās ķimikālijas, kas vitālo krāsvielu MTT spēj tieši reducēt (līdz MTT formazānam), var ietekmēt šūnu dzīvotspējas mērījumus un tādēļ koriģēšanai var būt nepieciešams izmantot pielāgotas kontroles (sk. 28.–34. punktu).

11. Vienai atsevišķai testēšanas reizei ar trim audu replikātiem jābūt pietiekamai gadījumos, kad testējamās ķīmiskās vielas klasifikācija ir nepārprotama. Tomēr ja rezultāti ir uz robežas, piemēram, replikātu mērījumiem trūkst konkordances un/vai vidējā procentuālā dzīvotspēja ir 50 ± 5 %, jāapsver, vai nav vajadzīga otrā testēšanas reize, kā arī vai nav vajadzīga trešā, ja nesakrīt abu pirmo divu testēšanas reižu rezultāti.

TESTA PRINCIPS

12. Testējamo ķimikāliju topikāli aplicē uz trīsdimensiju *RhE* modeļa, kuru veido nepārveidoti cilvēka epidermas keratinocīti, kas kultivēti tā, lai veidotos labi diferencēts daudzslāņains cilvēka epidermas modelis. Tam ir bazālais, spinālais un granulārais slānis, vairākslāņu *stratum corneum* ar lamelāriem lipīdu starpšūnu slāņiem, kuru uzbūve ir reprezentatīva galvenajām lipīdu klasēm *in vivo*.

13. Ķimikāliju izraisīts ādas kairinājums, kas izpaužas galvenokārt kā eritēma un tūska, ir notikumu kaskādes rezultāts, kuras sākums ir ķimikāliju penetrācija caur *stratum corneum*, kur tās var radīt bojājumus apakšējos keratinocītu un citu ādas šūnu slāņos. Bojātās šūnas var vai nu izdalīt iekaisuma mediatorus, vai izraisīt iekaisuma kaskādi, kas skar arī dermā esošās šūnas, jo īpaši asinsvadu stromālās un endoteliālās šūnas. Novēroto eritēmu un tūsku izraisa endoteliālo šūnu dilatācija un pieaugošā caurlaidība (29). Uz *RhE* balstītas testēšanas metodes ļauj bez vaskularizācijas *in vitro* testēšanas sistēmā, izmantojot šūnu dzīvotspējas rādījumus, mērīt kaskādes iniciācijas notikumus, piemēram, šūnu/audu bojājumus (16) (17).

14. Šūnu dzīvotspēju *RhE* modeļos mēra pēc vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu audu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (31). Kairinošas ķimikālijas tiek klasificētas pēc to spējas šūnu dzīvotspēju samazināt zemāk par noteiktu robežvērtību (t. i., ≤ 50 %, ANO *GHS* / *CLP* 2. kategorija). Atkarībā no tiesiskā regulējuma un testēšanas metodes piemērojamības ķimikālijas, kuru iedarbībā šūnu dzīvotspēja pārsniedz noteikto robežvērtību, var uzskatīt par kairinājumu neizraisošām (t. i., > 50 %, neklasificētas vielas).

▼M8

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

15. Pirms kādu no četriem šai testēšanas metodei atbilstošajiem validētajiem testa modeļiem (2. papildinājumā) sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 1. tabulā ieteiktās 10 standartvielas. Gadījumos, kad, piemēram, kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (8)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji. Alternatīvas standartvielas izmantošana ir jāpamato.

16. Ieteicams, lai kompetences pārbaudes ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjerfunkciju, kā precizējis *RhE* modeļa ražotājs. Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audu sūtījums veicis tālu ceļu vai aizņēmis ilgu laiku. Kad testēšanas metode ir sekmīgi ieviesta un tās izmantošanas prasme apgūta un uzskatāmi parādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt regulāri. Tomēr, ja testēšanas metodi izmanto parastajā praksē, ir ieteicams turpināt regulāri novērtēt barjerfunkciju.

1. tabula

Standartvielas ([1])

Viela	*CAS* Nr.	*In vivo* punkti ([2])	Agregātstāvoklis	ANO *GHS* kategorija
NEKLASIFICĒTAS VIELAS (ANO *GHS* nekategorizētas vielas)				
naftalīnetiķskābe	86-87-3	0	Ciets	Nekat.
izopropanols	67-63-0	0,3	Šķidrs	Nekat.
metilstearāts	112-61-8	1	Ciets	Nekat.
heptilbutirāts	5870-93-9	1,7	Šķidrs	Nekat. (*Fakult. 3. kat.*) ([3])
heksilsalicilāts	6259-76-3	2	Šķidrs	Nekat. (*Fakult. 3. kat.*) ([3])
KLASIFICĒTAS VIELAS (ANO *GHS* 2. kategorija)				
ciklamenaldehīds	103-95-7	2,3	Šķidrs	2. kat.
1-bromheksāns	111-25-1	2,7	Šķidrs	2. kat.
kālija hidroksīds (5 % ūd.)	1310-58-3	3	Šķidrs	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazīns	5271-27-2	3,3	Ciets	2. kat.
heptanāls	111-71-7	3,4	Šķidrs	2. kat.

([1]) Standartvielas ir validēšanas pētījumā izmantotu vielu apakškopa, un tās izraugās pēc šādiem kritērijiem: i) ķīmiskās vielas ir komerciāli pieejamas, ii) tās ir visam Dreiza [*Draize*] kairinājuma skalas diapazonam reprezentatīvas (no nekairinošām līdz stipri kairinošām), iii) tās ir ar precīzi noteiktu ķīmisko struktūru, iv) vielas ir reprezentatīvas validēšanas procesā izmantotajām ķīmiskajām funkcijām, v) tās vairākās testēšanas reizēs un vairākās laboratorijās devušas reproducējamus *in vitro* rezultātus, vi) par tām ir iegūtas pareizas prognozes *in vitro* un vii) tās nav ārkārtīgi toksiskas (piem., kancerogēnas vai reproduktīvajai sistēmai toksiskas) un to utilizācijas izmaksas nav pārlieku augstas.

([2]) *In vivo* punkti saskaņā ar TM B.4 (4).

([3]) Pēc šīs testēšanas metodes atsevišķi neklasificē vielas, ko var klasificēt ANO *GHS* 3. kat. (vāji kairinātāji) (1).

▼**M8**

PROCEDŪRA

17. Turpmāk aprakstīti ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās *RhE* testēšanas metodes komponenti un procedūras (sk. arī 3. papildinājumu par parametriem, kas attiecas uz katru testa modeli). Par četriem šai testēšanas metodei atbilstīgajiem modeļiem ir pieejamas darba standartprocedūras (*SOP*) (32) (33) (34) (35).

RHE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

18. Epitēlija rekonstruēšanai jāizmanto nepārveidoti cilvēka keratinocīti. Zem funkcionāla *stratum corneum* jābūt vairākiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu slāņiem (bazālajam slānim, *stratum spinosum, stratum granulosum*). *Stratum corneum* jābūt vairākslāņainam, ar tādu esenciālo lipīdu profilu, lai izveidotos funkcionējoša barjera, kura ir pietiekami robusta, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, nātrija dodecilsulfāta (SDS) vai *Triton X-100*, ātru penetrēšanos. Barjerfunkcija ir uzskatāmi jāparāda, un to var novērtēt, nosakot koncentrāciju, kurā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika samazina audu dzīvotspēju par 50 % (IC_{50}), vai nosakot ekspozīcijas laiku, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (ET_{50}). *RhE* modeļa aizturēšanas īpašībām jānovērš ap *stratum corneum* esošā materiāla pāreja dzīvotspējīgos audos, kuras dēļ var tikt nepareizi modelēta ekspozīcija uz ādu. *RhE* modelis nedrīkst būt kontaminēts ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

19. Dzīvotspējas kvantificēšanai izmanto MTT testu (31). *RhE* audu modeļa dzīvotspējīgās šūnas var vitālo krāsvielu MTT reducēt par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, kuras pēc tam tiek ekstrahētas no audiem, izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrakcijas šķīdinātāja optiskajam blīvumam (*OD*) jābūt pietiekami mazam, t. i., *OD*< 0,1. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantificēt, izmantojot vai nu standartabsorbcijas (*OD*) mērīšanu, vai *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). *RhE* modeļa lietotājiem jānodrošina, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst negatīvās kontroles vajadzībām definētajiem kritērijiem. *RhE* modeļa izstrādātājs/piegādātājs nosaka negatīvās kontroles *OD* vērtību pieņemamības diapazonu (augšējā un apakšējā robežvērtība) (ādas kairinājuma noteikšanai izmantojamās testēšanas metodes apstākļos). Pieņemamības diapazoni šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem *RhE* modeļiem ir norādīti 2. tabulā. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas lietotājam negatīvās kontroles *OD* diapazoni, kas norādīti 2. tabulā, jāizmanto par negatīvās kontroles pieņemšanas kritēriju. Jādokumentē ar negatīvo kontroli apstrādāto audu stabilitāte kultūrā (jābūt ar salīdzināmiem dzīvotspējas rādītājiem) visas testa ekspozīcijas perioda laikā.

2. tabula

Šajā TM iekļauto testa modeļu negatīvās kontroles *OD* vērtību pieņemamības diapazoni

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Barjerfunkcija

20. *Stratum corneum* un tā lipīdsastāvam jābūt pietiekamam, lai nepieļautu citotoksisku etalonķimikāliju, piemēram, SDS vai *Triton X-100*, strauju penetrēšanos, un to nosaka ar IC_{50} vai ET_{50} (3. tabula).

Morfoloģija

21. Jāveic *RhE* modeļa histoloģiski izmeklējumi, kas uzskatāmi parāda modeļa līdzību cilvēka epidermas struktūrai (ieskaitot vairākslāņu *stratum corneum*).

Reproducējamība

22. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda reproducējamība laikā.

Kvalitātes kontrole (QC)

23. *RhE* modelis jāizmanto tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs uzskatāmi parāda, ka visas izmantotās *RhE* modeļa partijas atbilst definētajiem produkcijas pieņemamības kritērijiem, kuru vidū svarīgākie ir *dzīvotspēja* (19. punkts), *barjerfunkcija* (20. punkts) un *morfoloģija* (21. punkts). Šie dati jādara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju iekļautu testēšanas pārskatā. *RhE* modeļa izstrādātājam/piegādātājam jānosaka IC_{50} vai ET_{50} vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). Kairinātāja klasifikācijas prognozēšanai ir derīgi tikai ar prasībām atbilstošiem audu modeļiem iegūtie rezultāti. Pieņemamības diapazoni šajā TM iekļautajiem četriem testa modeļiem ir norādīti 3. tabulā.

3. tabula

Šajā TM iekļauto testa modeļu partiju *QC* pieņemamības kritēriji

	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiSkin™ (SM) (18 stundu apstrāde ar SDS)(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 h	ET_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % *Triton X-100*)(34)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 stundu apstrāde ar SDS)(35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Testējamo un kontroles ķimikāliju aplicēšana

24. Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolei katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz trīs replikāti. Testējamās ķimikālijas, kas ir šķidras vai cietas vielas, uz epidermas virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, t. i., no 26 līdz 83 µl/cm^2 vai mg/cm^2, raugoties, lai deva nebūtu pārmērīga (sk. 3. papildinājumu). Pirms cietu ķimikāliju aplicēšanas epidermas virsma jāsamitrina ar dejonizētu vai destilētu ūdeni, lai nodrošinātu labāku testējamās ķimikālijas un epidermas virsmas kontaktu. Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Dažos gadījumos vielas izlīdzināšanai var izmantot neilona tīkliņu (sk. 3. papildinājumu). Ekspozīcijas perioda beigās testējamā ķimikālija no epidermas virsmas rūpīgi jānoskalo ar buferšķīdumu vai 0,9 % NaCl. Atkarībā no izmantotā *RhE* testa modeļa ekspozīcijas periods ilgst no 15 līdz 60 minūtēm un inkubācijas temperatūra ir no 20 līdz 37 °C. Minētos ekspozīcijas periodus un temperatūras optimizē katrai *RhE* testēšanas metodei atsevišķi, un tie reprezentē testa modeļu atšķirīgās būtiskās īpašības (piemēram, barjerfunkcija) (sk. 3. papildinājumu).

25. Katrā izpildes reizē jāizmanto paralēlā negatīvā kontrole (*NC*) un pozitīvā kontrole (*PC*), lai uzskatāmi parādītu, ka audu dzīvotspēja (izmanto *NC*), barjerfunkcija un no tās izrietošais audu jutīgums (izmanto *PC*) atbilst noteiktam vēsturiskam pieņemamības diapazonam. Ieteicamā *PC* ir SDS 5 % šķīdums ūdenī. Ieteicamā NK ir ūdens vai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums (PBS).

Šūnu dzīvotspējas mērījumi

26. Saskaņā ar testa procedūru ir svarīgi, lai dzīvotspējas mērīšana tiktu veikta nevis tūlīt pēc testējamās ķimikālijas ekspozīcijas, bet gan pēc tam, kad ir pagājis pietiekami ilgs noskaloto audu pēcapstrādes inkubācijas periods jaunā barotnē. Minētajā periodā izzūd vājas citotoksiskas iedarbības pazīmes un parādās nepārprotamas citotoksiskas iedarbības izpausmes. Optimizējot divus no šai testēšanas metodei pamatā esošajiem *RhE* testa modeļiem, tika konstatēts, ka optimāls ir 42 stundu ilgs pēcapstrādes inkubācijas periods (11) (12) (13) (14) (15).

27. Šūnu dzīvotspējas mērīšanai saskaņā ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode ir MTT tests. Tā ir audu trīsdimensiju modelim piemērota metode. Audu paraugu uz 3 stundām ievieto atbilstošas koncentrācijas (piemēram, 0,3–1 mg/ml) MTT šķīdumā. Dzīvotspējīgās šūnas pārveido MTT par zilas krāsas formazānu. Pēc tam veic nogulsnētā zilas krāsas formazāna produkta ekstrakciju ar šķīdinātāju (piemēram, izopropanolu vai paskābinātu izopropanolu) un nosaka formazāna koncentrāciju, mērot optisko blīvumu pie viļņa garuma 570 nm ± 30 nm vai izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36).

28. Testējamās ķimikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskā iedarbība uz MTT (piemēram, ķimikālija var gan kavēt, gan veicināt krāsas veidošanos vai atkrāsošanos) var traucēt testu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi. Tas var notikt gadījumos, kad testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no audiem vai tad, ja tā penetrējas epidermā. Ja testējamā ķimikālija tieši iedarbojas uz MTT (piemēram, MTT reducētājs), tai ir dabiska krāsa vai krāsa izveidojas ekspozīcijas laikā, testējamās ķimikālijas radīto dzīvotspējas

▼M8

mērījumu traucējumu noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 29. un 33. punktu). Darba standartprocedūrās par šajā testēšanas metodē iekļautajiem četriem validētajiem modeļiem ir pieejams sīks apraksts par to, kā koriģēt tiešo MTT redukciju un interferenci, ko rada krāsvielas (32) (33) (34) (35).

29. Lai noteiktu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi sagatavotam MTT šķīdumam. Ja testējamo ķimikāliju saturošais MTT maisījums iekrāsojas zilā/violetā krāsā, uzskata, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un jāveic no standartabsorbcijas (*OD*) mērīšanas vai *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūras neatkarīga nedzīvotspējīgo *RhE* šūnu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nedzīvus audus, kam piemīt tikai reziduāla metaboliska aktivitāte, taču tie testējamo ķimikāliju absorbē līdzīgi kā dzīvotspējīgi audi. Katru MTT reducējošu testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem nedzīvo audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru ar mērķi ģenerēt nespecifisku MTT redukciju (*NSMTT*) (32) (33) (34) (35). Neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu/izpildes reižu skaita katrai testējamajai ķimikālijai ir pietiekami veikt vienu *NSMTT* kontroli. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas MTT redukcijas procentus, kas iegūti ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam (*%NSMTT*).

30. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas, kurām ir krāsa, vai testējamās ķimikālijas, kuras krāsu iegūst, nonākot saskarē ar ūdeni vai izopropanolu, un lemtu par papildu kontroļu nepieciešamību, jāveic testējamās ķimikālijas spektrālanalīze ūdenī (ekspozīcijas vide) un/vai izopropanolā (ekstrakcijas šķīdums). Ja testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē gaismu 570 ± 30 nm diapazonā, jāveic turpmākas krāsvielu kontroles vai arī jāizmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūra, kuras gadījumā kontroles nav vajadzīgas (sk. 33. un 34. punktu). Mērot standartabsorbciju (OD), katru interferējošo iekrāsoto testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu nespecifiskas krāsas (NSC_{living}) kontroli, MTT inkubācijas solī tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, NSC_{living} kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķimikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga NSC_{living} kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem, atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT (%NSC_{living}).

31. Mērot tādu testējamo ķimikāliju standartabsorbciju (*OD*), par kurām konstatēts, ka tās gan tieši reducē MTT (sk. 29. punktu), gan izraisa krāsu interferenci (sk. 30. punktu), papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un NSC_{living} kontrolēm jābūt arī kādam trešajam kontroļu kopumam. Tas parasti attiecas uz MTT testu traucējošām tumšas (piem., zilas, violetas, melnas) krāsas testējamajām ķimikālijām, jo tām raksturīgās krāsas dēļ ir grūti novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 29. punktā. Šīs testējamās ķimikālijas var piesaistīties gan dzīviem, gan nedzīviem audiem, un tāpēc ar *NSMTT* kontroli var koriģēt ne tikai iespējamu tiešu MTT

▼**M8**

redukciju, ko izraisa testējamā ķimikālija, bet arī krāsas interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas piesaistīšanās nedzīviem audiem. Tā rezultātā var notikt dubulta krāsas interferences korekcija, jo ar NSC_{living} kontroli jau tiek koriģēta krāsas interference, ko rada testējamās ķimikālijas piesaistīšanās dzīviem audiem. Lai izvairītos no iespējamas dubultas krāsas interferences korekcijas, ir jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvos audos (NSC_{killed}). Šajā papildu kontrolē testējamo ķimikāliju izmanto vismaz diviem nedzīvu audu replikātiem, kam veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Katrai ķimikālijai neatkarīgi no veikto testu/izpildes reižu skaita ir pietiekami veikt vienu NSC_{killed} kontroli, taču tā jāveic paralēli *NSMTT* kontrolei un, ja iespējams, ar to pašu audu partiju. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT* un $\%NSC_{living}$ un pieskaitot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar traucējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nedzīviem audiem un aprēķināti attiecībā pret negatīvo kontroli, kas veikta paralēli koriģējamajam testam ($\%NSC_{killed}$).

32. Svarīgi atzīmēt, ka nespecifiskas MTT redukcijas un nespecifiskas krāsas interferenču dēļ var tikt iegūti audu ekstrakta rādījumi, kas pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu. Tādēļ katrai laboratorijai pirms regulatīvos nolūkos veicamas testējamo ķimikāliju testēšanas sākšanas jānosaka sava spektrofotometra linearitātes diapazons, izmantojot komerciāli pieejamu MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7). Gadījumos, kad tādu audu ekstraktu optiskais blīvums, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju, neveicot korekcijas par tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, ir spektrofotometra lineārā diapazona robežās vai ar testējamo ķimikāliju iegūtā nekoriģētā dzīvotspēja procentos jau ir $\leq$ 50 %, tiešo MTT reducētāju un interferējošas krāsas testējamo ķimikāliju novērtēšanai ir atbilstoši veikt standartabsorbcijas (*OD*) mērījumus ar spektrofotometru. Tomēr par testējamām ķimikālijām iegūtie rezultāti, kas uzrāda *%NSMTT* un/vai $\%NSC_{living} \geq 50\ \%$ no negatīvās kontroles, būtu jāuztver piesardzīgi, jo tos izmanto par robežvērtību klasificēto un neklasificēto ķimikāliju noškiršanai (sk. 36. punktu).

33. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa un kuras nav piemērotas standarta absorbcijas (*OD*) mērījumiem, jo pārāk lielā mērā interferē ar MTT testu, MTT formazāna mērīšanai var izmantot alternatīvo *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 34. punktu) (36). *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēma ļauj pirms kvantificēšanas MTT formazānu atdalīt no testējamās ķimikālijas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Taču, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, vai tai ir krāsa, kas traucē novērtēt ķimikālijas spēju tieši reducēt MTT (kā aprakstīts 29. punktā), ir jāizmanto *NSMTT* kontroles. Izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes

▼M8

laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, atņemot *%NSMTT*. Visbeidzot jāatzīmē, ka tiešos MTT reducētājus, kuri arī var radīt krāsas interferenci, kurus pēc apstrādes saglabā audos un kuri reducē MTT tik spēcīgi, ka testētā audu ekstrakta *OD* (izmantojot standarta *OD* mērīšanu) vai smailes laukumi (izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju) pārsniedz spektrofotometra linearitātes diapazonu, nevar novērtēt, taču šādi gadījumi ir ļoti reti.

34. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot arī ar visa veida ķimikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (36). Ņemot vērā *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu daudzveidību, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmanto, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36) (37). Minētie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 4. papildinājumā. Ja ir izpildīti 4. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu MTT formazāna mērījumu veikšanai ar šajā testēšanas metodē aprakstītajiem eksperimentēšanas nosacījumiem.

Pieņemamības kritēriji

35. Katrai testēšanas metodei, kurā izmanto testēšanai derīgas *RhE* modeļu partijas (sk. 23. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādātajiem audiem noteiktajām optiskā blīvuma vērtībām jāraksturo šo audu kvalitāte visos nosūtīšanas un saņemšanas cikla posmos un visos protokola procesos. Optiskā blīvuma kontrolvērtības nedrīkst būt zemākas par vēsturiski noteiktajām robežvērtībām. Tāpat arī audiem, kas apstrādāti ar pozitīvās kontroles vielām, piemēram, SDS 5 % šķīdumu ūdenī, būtu jāatspoguļo to spēja reaģēt uz kairinošu ķimikāliju šīs testa metodes apstākļos (sk. 3. papildinājumu un papildinformāciju šajā *TG* iekļauto četru testa modeļu *SOP* (32) (33) (34) (35)). Saistītajiem attiecīgajiem audu replikātu mainības mērījumiem, t. i., standartnovirzēm, ir jāatbilst pieņemamības robežvērtībām, kas noteiktas izmantotajam testa modelim (sk. 3. papildinājumu).

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

36. Katrai testējamajai ķimikālijai iegūtās *OD* vērtības var izmantot dzīvotspējīgo šūnu daļas aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kuru pieņem par 100 %. Ja izmanto *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, audu dzīvotspēju aprēķina kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, un MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, attiecību procentos. Precīzi jānosaka un jādokumentē šūnu dzīvotspējas robežvērtība, pēc kuras identificē un atšķir testējamās kairinošās ķimikālijas no šādi neklasificētajām ķimikālijām, kā arī testēšanas rezultātu izvērtēšanai izmantotās statistiskās procedūras, un uzskatāmi jāparāda to piemērotība (informācijai sk. testa modeļu *SOP*). Kairināmības prognozēšanas robežvērtības ir šādas:

▼M8

— ja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas vidējā audu dzīvotspēja procentos ir mazāka nekā vai vienāda ar (≤) 50 %, ķimikāliju identificē kā tādu, kas jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* (2. kategorija vai 1. kategorija). Tā kā ar šajā testēšanas metodē iekļautajiem *RhE* testa modeļiem nav iespējams noteikt, vai ķimikālija ietilpst ANO *GHS* / *CLP* 1. vai 2. kategorijā, lēmuma pieņemšanai par galīgo klasifikāciju ir vajadzīga papildinformācija par ādas koroziju [sk. arī ESAO norādījumu dokumentu par *IATA* (3)]. Ja tiek konstatēts, ka testējamā ķimikālija nav kodīga (piemēram, pamatojoties uz *TM* 40, B.40a vai B.65), un audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir mazāka nekā vai vienāda ar (≤) 50 %, uzskata, ka testējamā ķimikālija izraisa tādu ādas kairinājumu, ka tā jāklasificē ANO *GHS* / *CLP* 2. kategorijā;

— ja audu dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcapstrādes inkubēšanas ir lielāka par (>) 50 %, atkarībā no dalībvalstu tiesiskā regulējuma var uzskatīt, ka testējamā ķimikālija neizraisa ādas kairinājumu un ANO *GHS* / *CLP* sistēmā ir neklasificēta viela.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

37. Par katru izpildes reizi, arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tos veic, tabulas veidā apkopo visus datus par visiem audu replikātiem (piemēram, optiskā blīvuma vērtības, procentos aprēķinātas šūnu dzīvotspējas datus par katru ķimikāliju un tās klasifikācijas datus). Par katru izpildes reizi jānorāda rezultāta vidējā vērtība ± standartnovirze. Par katru testējamo ķimikāliju jādokumentē novērotā iedarbība ar MTT reaģentu un testējamo ķimikāliju, kurai ir krāsa.

Testēšanas pārskats

38. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles ķimikālijas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un papildu relevantās fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontroles ķimikāliju pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Izmantotais *RhE* modelis un protokols (un attiecīgās izvēles pamatojums)

▼**M8**

Testa apstākļi:

— izmantotais *RhE* modelis (arī partijas numurs);

— MTT kvantificēšanai izmantotās mērierīces (piemēram, spektrofotometra) kalibrēšanas dati, viļņa garums un frekvenču joslas filtrs (attiecīgā gadījumā), un mērierīces linearitātes diapazons; MTT formazāna kvantificēšanai izmantotās metodes apraksts;

— *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmas kvalifikācijas apraksts (attiecīgā gadījumā); pilnīga papildinformācija par izmantoto *RhE* modeli un tā veiktspējas raksturlielumiem. No tiem jānorāda vismaz:

i) dzīvotspēja;

ii) barjerfunkcija;

iii) morfoloģija;

iv) reproducējamība un prognozējamība;

v) modeļa kvalitātes kontroles (*QC*);

— vēsturiskie dati par modeli. No tiem jānorāda vismaz kvalitātes kontroles datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem;

— apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartvielu testēšanu.

Testa procedūra:

— detalizēta informācija par izmantoto testa procedūru (arī par mazgāšanas procedūrām, ko izmanto pēc ekspozīcijas perioda); testējamās ķimikālijas deva un izmantotās kontroles;

— ekspozīcijas ilgums un temperatūra un pēcekspozīcijas inkubēšanas laiks;

— kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā);

— izmantoto audu replikātu skaits katrai ķimikālijai un kontrolei (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un *NSMTT*, NSC_{living} un NSC_{killed}, ja tāda veikta);

— apraksts par lēmuma pieņemšanas kritēriju / prognozes modeli, kas piemērots, pamatojoties uz izmantoto *RhE* modeli;

— testa procedūras (arī mazgāšanas procedūru) modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji:

— pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem; pieņemama mainība starp pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem;

▼**M8**

— pieņemama mainība starp testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Rezultāti:

— tabulā apkopoti dati par individuālu testējamo ķimikāliju par katru izpildes reizi un katru replikāta mērījumu, tostarp *OD* vai MTT formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos un standartnovirze;

— attiecīgā gadījumā — to kontroļu rezultāti, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa, tostarp *OD* vai MTT formazāna smailes laukums, *%NSMTT*, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, standartnovirze, pareiza galīgā audu dzīvotspēja procentos;

— rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolēm, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem;

— jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-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", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".

(5) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP)".

(6) Šā pielikuma B.40a nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests"

(7) Šā pielikuma B.65. nodaļa "*In vitro* barjermembrānas testa metode".

▼**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 in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (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 Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and 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. and 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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. and 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. and 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) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 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 (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 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., and 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. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Šūnu dzīvotspēja: parametrs, kas raksturo šūnu populācijas kopējo aktivitāti, piemēram, šūnu mitohondriju dehidrogenāžu spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds, tiazolilzilais), kas atkarībā no nosakāmā testēšanas beigupunkta un izmantotā testēšanas plāna korelē ar dzīvo šūnu kopējo skaitu un/vai dzīvotspēju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: tādu testa modeļu veiktspējas mērs, ar kuriem iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (9).

ET_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc ekspozīcijas laika, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams šūnu dzīvotspējas samazināšanai par 50 % (sk. arī IC_{50}).

***GHS* (Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

HPLC: augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija.

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

IC_{50}: parametrs, ko var aprēķināt pēc etalonķimikālijas koncentrācijas, kurā audu dzīvotspēja pēc noteikta ekspozīcijas laika samazinās par 50 % (IC_{50}) (sk. arī ET_{50}).

Pārmērīga deva: uz epidermas aplicētās testējamās ķimikālijas daudzums, kas ir lielāks par epidermas virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

▼M8

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilā tetrazolija bromīds.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC_{living}: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiska MTT redukcija.

Veiktspējas standarti (VS): uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (9).

PC: pozitīvā kontrole, replikāts, kuram ir visi testēšanas sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām (9).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas vienlaikus testē ar negatīvu kontroli un pozitīvu kontroli.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķimikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

▼**M8**

Ādas kairinājums *in vivo*: atgriezenisks ādas bojājums, kas rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz laiku līdz četrām stundām. Ādas kairinājums ir lokāla skarto ādas audu reakcija, kas parādās neilgi pēc kairinātāja iedarbības (38). To izraisa lokāla iekaisuma reakcija, kas saistīta ar ādas audu dabisko (nespecifisko) imūnsistēmu. Tā svarīgākā iezīme ir procesu atgriezeniskums, kas saistīti ar iekaisuma reakcijām un ar iekaisuma procesu saistītā kairinājuma raksturīgo klīnisko pazīmju (eritēma, tūska, nieze un sāpes) lielāko daļu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UPLC: īpaši augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼**M8**

2. papildinājums

ŠAJĀ TESTĒŠANAS METODĒ IEKĻAUTIE TESTA MODEĻI

Nr.	Testa modeļa nosaukums	Validācijas pētījuma veids	Atsauces
1	*EpiSkin*™	Pilnīgs provizoriskās validācijas pētījums (2003–2007). Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto *ECVAM* VS (39) (40) (21) (*) būtiskos testēšanas metodes komponentus. Turklāt metodes dati, kas saistīti ar neklasificēto/klasificēto vielu identifikāciju, veidoja galveno pamatu sākotnējo VS (*) specifiskuma un jutības vērtību noteikšanai.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	*EpiDerm™ SIT (EPI-200)*	*EpiDerm™* (*oriģināls*): šim testa modelim, tāpat kā 1. modelim, pilnīga provizoriskā validācija veikta 2003.–2007. gadā. Šā modeļa komponenti tika izmantoti, lai noteiktu sākotnējo un atjaunināto *ECVAM* VS (39) (40) (21) (*) būtiskos testēšanas metožu komponentus. ***EpiDerm™ SIT (EPI-200):*** Oriģinālā modeļa *EpiDerm™* modifikācija validēta, izmantojot sākotnējos *ECVAM* VS (21) 2008. gadā (*).	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	*SkinEthic™ RHE*	Validācijas pētījums balstīts uz sākotnējiem *ECVAM* veiktspējas standartiem (21) 2008. gadā (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	*LabCyte EPI-MODEL24 SIT*	Validācijas pētījums (2011–2012) balstīts uz ESAO *TG* Nr. 439 (8) veiktspējas standartiem (VS), kuri balstīti uz atjauninātajiem *ECVAM* VS (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) un šīs *TG* (8) veiktspējas standarti. (*)

(*) Sākotnējie *ECVAM* veiktspējas standarti (VS) (21) tika izstrādāti 2007. gadā pēc tam, kad bija pabeigts provizoriskās validācijas pētījums (16), kurā novērtēta 1. un 2. testa modeļa veiktspēja, pamatojoties uz klasifikācijas sistēmu, kas aprakstīta ES Bīstamo vielu direktīvas 28. grozījumā (41). 2008. gadā tika ieviesta ANO *GHS* (1) un ES *CLP*, un robežvērtība, ko izmanto neklasificētu vielu nošķiršanā no klasificētām vielām, mainīta no 2.0 uz 2.3 *in vivo* punktiem. Lai pielāgotos šīm mainītajām regulatīvajām prasībām, 2009. gadā tika atjauninātas *ECVAM* VS pareizības vērtības un references ķimikāliju saraksts (2) (39) (40). Tāpat kā sākotnējie VS, arī atjauninātie VS bija lielā mērā balstīti uz 1. un 2. modeļa datiem (16), taču papildus izmantoti 3. modeļa dati par references ķimikālijām. Atjauninātos *ECVAM* VS 2010. gadā izmantoja ar šo *TG* (8) saistīto VS noteikšanai. Šajā testēšanas metodē *EpiSkin*™ tiek uzskatīts par *VRM*, jo to izmantoja visu VS kritēriju izstrādē. Detalizēta informācija par validācijas pētījumiem, iegūto datu apkopojums un pamatinformācija par VS pielāgojumiem, kas veicami pēc ANO *GHS*/*CLP* ieviešanas, atrodama *ECVAM*/*BfR* paskaidrojošajā pamatdokumentā, kas pievienots atbilstīgajai ESAO *TG* Nr. 439 (23).

SIT: ādas kairinājuma tests.

RHE: cilvēka epidermas rekonstrukcija.

▼**M8**

3. papildinājums

PROTOKOLA PARAMETRI KATRAM ŠAJĀ TESTĒŠANAS METODĒ IEKĻAUTAJAM TESTA MODELIM

RhE modeļiem ir ļoti līdzīgi protokoli, un jo īpaši tiem visiem ir 42 stundu ilgs pēcinkubācijas periods (32) (33) (34) (35). Galvenokārt atšķiras trīs parametri, kas saistīti ar dažādajām testa modeļu barjerfunkcijām, proti, A) pirmsinkubācijas laiks un tilpums, B) testējamo ķimikāliju aplicēšana un C) pēcinkubācijas tilpums.

	EpiSkin™ (SM)	*EpiDerm™ SIT (EPI-200)*	*SkinEthic RHE™*	*LabCyte EPI-MODEL24 SIT*
A) Pirmsinkubācija				
Inkubācijas laiks	18–24 stundas	18–24 stundas	< 2 stundas	15–30 stundas
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml	0,3 vai 1 ml	0,5 ml
B) Testējamās Ķimikālijas Aplicēšana				
Šķidrumi	10µl (26µl/cm^2)	30µl (47µl/cm^2)	16µl (32µl/cm^2)	25µl (83 µl/cm^2)
Cietvielas	10 mg (26 mg/cm^2) + *DW* (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + *DPBS* (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + *DW* (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + *DW* (25 µl)
Vai izmanto neilona tīkliņu?	Neizmanto	Vajadzības gadījumā izmanto	Izmanto	Neizmanto
Kopējais aplicēšanas laiks	15 minūtes	60 minūtes	42 minūtes	15 minūtes
Aplicēšanas temperatūra	*RT*	a) *RT* 25 minūtes b) 37°C 35 minūtes	*RT*	*RT*
C) Pēcinkubācijas tilpums				
Vidējs tilpums	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Maksimālais pieļaujamais mainīgums				
Standartnovirze (*SD*) starp audu replikātiem	*SD*18	*SD*18	*SD*18	*SD*18

RT: istabas temperatūra.
DW: destilēts ūdens.
DPBS: Dulbeko fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums

▼**M8**

4. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO RHE AUDIEM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS HPLC UPLC SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Protokols saskaņā ar *FDA* norādījumiem (36) (37)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem dzīviem *RhE* audiem), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātiem nedzīviem *RhE* audiem) analīze	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20\ \%$ no laukuma_{LLOQ} [1]
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 µg/ml, 16 µg/ml un 160 µg/ml) izopropanolā (n=5)	*CV* ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ*
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% novirze ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ*
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	85 % ≤ matrices efekts % ≤ 115 %
Pārnese	Izopropanola analīze pēc *ULOQ* [2] standarta	$\text{Laukums}_{\text{interference}} \leq 20\ \%$ no laukuma_{LLOQ}
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 µg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % novirze ≤ 15 % vai ≤ 20 % attiecībā uz *LLOQ* Kvalitātes kontroles: % novirze ≤ 15 % un *CV* ≤ 15 %
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena:: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīga stabilitāte *RhE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	%Novirze ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīga stabilitāte *RhE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas noteiktā temperatūrā (piem., 4 °C, -20 °C, -80 °C)	%Novirze ≤ 15 %

([1]) *LLOQ*: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu 1–2 % audu dzīvotspēju, proti, 0,8 µg/ml.

([2]) *ULOQ*: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas ir vismaz divas reizes augstāka par lielāko sagaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos, proti, 200 µg/ml.

▼M7

B.47. **LIELLOPU RADZENES APDULĶOŠANĀS UN CAURLAIDĪBAS TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ I) NOPIETNU ACU BOJĀJUMU INDUCĒTĀJAS ĶIMIKĀLIJAS UN II) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ PAR TĀDĀM, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS**

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 437 (2013). Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības (*BCOP*) testēšanas metodi 2006. un 2010. gadā izvērtēja Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (*ICCVAM*) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*ECVAM*) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*JaCVAM*) (1) (2). Pirmajā izvērtēšanā *BCOP* testēšanas metode tika analizēta attiecībā uz tās lietderīgumu acu nopietnu bojājumu izraisītāju ķimikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanā (1). Otrajā izvērtēšanā *BCOP* testēšanas metode tika analizēta attiecībā uz tās lietderīgumu tādu ķimikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanā, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu un nopietnus acu bojājumus (2). *BCOP* validācijas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 vielas un 100 maisījumi (2) (3). No šīm izvērtēšanām un to profesionālvērtēšanas tika secināts, ka ar šo testēšanas metodi ir iespējams pareizi identificēt ķimikālijas (gan vielas, gan maisījumus), kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (1. kategorija), kā arī tādas, kuras nav jāklasificē par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, atbilstoši definīcijām, kas dotas Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (4) un Regulu (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]), tāpēc tā tika atzīta par zinātniski derīgu abiem nolūkiem. Nopietni acu bojājumi ir acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Testējamās ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, ir klasificētas ANO *GHS* 1. kategorijā. Ķimikālijas, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar definīciju ir ķimikālijas, kuras neatbilst priekšnosacījumiem klasificēšanai ANO *GHS* 1. vai 2. kategorijā (2.A vai 2.B), t. i., tās tiek uzskatītas par ANO *GHS* nekategorizētām ķimikālijām. Šajā testēšanas metodē ietilpst *BCOP* testēšanas metodes ieteicamais lietojums un ierobežojumi, pamatojoties uz tās izvērtējumiem. Galvenās atšķirības starp ESAO testēšanas vadlīnijas sākotnējo 2009. gada versiju un atjaunināto 2013. gada versiju attiecas uz (bet ne tikai): *BCOP* testēšanas metodes izmantošanu tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras nav klasificējamas saskaņā ar ANO *GHS* (2. un 7. punkts); skaidrojumiem par *BCOP* testēšanas metodes pielietojamību spirtu, ketonu un cietvielu (6. un 7. punkts) un vielu un maisījumu testēšanai (8. punkts); skaidrojumiem par to, kā būtu jātestē virsmaktīvas vielas un virsmaktīvu vielu saturoši maisījumi (28. punkts); atjauninājumiem un skaidrojumiem par pozitīvajām kontrolēm (39. un 40. punkts); atjauninātajiem *BCOP* testēšanas metodes lēmuma pieņemšanas kritērijiem (47. punkts); atjauninātajiem pētījuma pieņemšanas kritērijiem (48. punkts); testēšanas pārskata elementu atjauninājumiem (49. punkts); atjauninātu 1. papildinājumu par definīcijām; pievienoto 2. papildinājumu par *BCOP* testēšanas metodes prognozētspēju dažādās klasifikācijas sistēmās; atjauninātu 3. papildinājumu — standarta ķimikāliju sarakstu; un atjauninātu 4. papildinājumu par *BCOP* radzenes turētāju (1. punkts) un par opacitometru (2. un 3. punkts).

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp..).

▼M7

Šobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt Dreiza *in vivo* acu testu un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķimikāliju klasēm. Tomēr Dreiza acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (5). Lejupējā pieeja (5) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķimikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls, savukārt augšupējā pieeja (5) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķimikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē. *BCOP* testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem var izmantot tam, lai ķimikālijas klasificētu un marķētu kā acīm bīstamas. Kaut arī šo *BCOP* testēšanas metodi vienu pašu neuzskata par derīgu aizstājēju trušu acu *in vivo* testam, to ieteicams izmantot par sākotnējo soli testēšanas stratēģijā, piemēram, *Scott et al.* (5) ierosinātajā lejupējā pieejā, lai identificētu ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, t. i., ķimikālijas, kuras bez papildu testēšanas jāklasificē ANO *GHS* 1. kategorijā (4). *BCOP* testēšanas metodi ieteicams izmantot arī tam, lai identificētu ķimikālijas, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem, saskaņā ar ANO *GHS* (ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas) (4) tādā testēšanas stratēģijā kā augšupējā pieeja (5). Taču, ja ar *BCOP* testēšanas metodi netiek prognozēts, ka ķimikālija izraisa nopietnus acu bojājumus vai klasificējama par acu kairinājumu/nopietnu acu bojājumu izraisītāju, tā jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai noteiktu tās galīgo klasifikāciju.

Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm, ko mēra ar tās spēju izraisīt izolētas liellopu acs radzenes apduļķošanos un palielināt tās caurlaidību. Toksisko ietekmi uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) gaismas caurlaidības samazināšanās (apduļķošanās), (ii) krāsvielas fluoresceīna nātrija sāls caurlaidības palielināšanās (caurlaidība). Radzenes apduļķošanās un caurlaidības vērtējumu pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai apvieno, lai noteiktu *in vitro* kairinājuma rādītāju (*IVIS*), ko izmanto testējamās ķimikālijas radītā kairinājuma pakāpes klasificēšanai.

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šīs testēšanas metodes pamatā ir *ICCVAM BCOP* testēšanas metodes protokols (6) (7), kas sākotnēji tika izstrādāts no informācijas, kas iegūta no *In vitro* pētījumu institūta (*IIVS*) protokola un *INVITTOX* protokola Nr. 124 (8). Pēdējais ir Eiropas Kopienas sponsorētajā 1997.–1998. gadā veiktajā prevalidācijas pētījumā izmantotais protokols. Abu protokolu pamatā bija *BCOP* testēšanas metode, ko pirmoreiz aprakstījuši *Gautheron et al.* (9).

Ar *BCOP* testēšanas metodi var identificēt ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar ANO *GHS* definīciju, t. i., ANO *GHS* 1. kategorijā klasificējamas ķimikālijas (4). Ja *BCOP* testēšanas metodi izmanto šim nolūkam, tās vispārējā pareizība ir 79 % (150/191), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 25 % (32/126) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 14 % (9/65), salīdzinot ar truša acu *in vivo* testēšanas metodes datiem, kas klasificēti atbilstoši ANO *GHS* klasifikācijas sistēmai (3) (sk. 1. tabulu 2. papildinājumā). Ja no datubāzes izslēdz testējamās ķimikālijas, kuras ietilpst noteiktu ķīmisko (t. i., spirti, ketoni) vai fizikālo (t. i., cietvielas) īpašību grupās, *BCOP* testēšanas metodes vispārējā pareizība ANO *GHS* klasifikācijas sistēmā ir 85 % (111/131), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 20 % (16/81) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 8 % (4/50) (3). *BCOP* testēšanas metodes iespējamie trūkumi, ja ar to identificē ķimikālijas, kas rada nopietnus acu bojājumus (ANO *GHS* 1. kategorija), attiecas uz validācijas datubāzē novērotu lielu pseidopozitīvu rezultātu īpatsvaru spirtiem un ketoniem un lielu pseidonegatīvu rezultātu īpatsvaru cietvielām (1) (2) (3). Tomēr, tā kā ne visi spirti un ketoni ar *BCOP* testēšanas metodi ir pārvērtēti un

▼M7

daži ir pareizi novērtēti ANO *GHS* 1. kategorijā, netiek uzskatīts, ka šīs divas organiskās funkcionālās grupas neietilpst šīs testēšanas metodes piemērojamības jomā. Šīs testēšanas metodes lietotājam pašam jāizlemj, vai spirta vai ketona iespējamā pārvērtēšana ir pieņemama vai arī jāveic turpmāka testēšana, izsverot pierādījumus. Attiecībā uz cietvielu pseidonegatīvo rezultātu rādītāju jāpiemin, ka cietvielas Dreiza acu kairinājuma *in vivo* testā var izraisīt mainīgas un pārmērīgas ekspozīcijas apstākļus, kā rezultātā var rasties neatbilstošas prognozes par to patieso kairinājuma potenciālu (10). Vēl jāpiebilst, ka nevienam no *ICCVAM* validācijas datubāzē identificētajiem pseidonegatīvajiem rezultātiem (2) (3) saistībā ar acu nopietnu bojājumu izraisītāju ķimikāliju identificēšanu (ANO *GHS* 1. kategorija) *IVIS* rezultāts nav bijis ≤ 3, ko izmanto par kritēriju testējamās ķimikālijas identificēšanai par ANO *GHS* nekategorizētu ķimikāliju. Turklāt šajā gadījumā *BCOP* pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuras rada 3 < *IVIS* ≤ 55, pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētiem *in vitro* testiem vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. Ņemot vērā to, ka *BCOP* testēšanas metode pareizi novērtē dažas cietās ķimikālijas kā ANO *GHS* 1. kategorijai piederošas, netiek arī uzskatīts, ka šis fizikālais stāvoklis neietilpst šīs testēšanas metodes piemērojamības jomā. Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu ķimikālijām, *IVIS* > 55 pieņemot kā norādi uz nopietnus acu bojājumus izraisošu atbildreakciju, kas liecina, ka ķimikālija bez tālākas testēšanas klasificējama ANO *GHS* 1. kategorijā. Taču, kā norādīts iepriekš, ar spirtiem un ketoniem iegūtie pozitīvie rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas iespējamības dēļ.

BCOP testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO *GHS* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām (4). Ja *BCOP* testēšanas metodi izmanto šim nolūkam, tās vispārējā pareizība ir 69 % (135/196), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 69 % (61/89) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 0 % (0/107), salīdzinot ar truša acu *in vivo* testēšanas metodes datiem, kas klasificēti atbilstīgi ANO *GHS* klasifikācijas sistēmai (3) (sk. 2. tabulu 2. papildinājumā). Iegūtais pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars (*in vivo* ANO *GHS* nekategorizētas ķimikālijas, kuras rada *IVIS* > 3, sk. 47. punktu) ir ievērojami liels, bet šajā gadījumā tam nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuras rada 3 < *IVIS* ≤ 55, pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētiem *in vitro* testiem vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. *BCOP* testēšanas metodei nav konkrētu trūkumu spirtu, ketonu un cietvielu testēšanā, ja mērķis ir identificēt ķimikālijas, kuras nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām (ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas) (3). Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu testējamajām ķimikālijām, negatīvu rezultātu (*IVIS* ≤ 3) pieņemot par norādi, ka klasificēšana nav nepieciešama (ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas). Tā kā ar *BCOP* testēšanas metodi iespējams pareizi identificēt tikai 31 % ķimikāliju, kuras nav jāklasificē par acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājām, šī testēšanas metode nebūtu jāizvēlas kā pirmā, sākot augšupēju pieeju (5), ja ir pieejamas citas validētas un vispārpieņemtas *in vitro* metodes ar tikpat augstu jutību, bet lielāku specifiskumu.

▼M7

BCOP validācijas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 vielas un 100 maisījumi (2) (3). Tādēļ *BCOP* testēšanas metode tiek uzskatīta par piemērojamu gan vielu, gan maisījumu testēšanai.

BCOP testēšanas metodi nav ieteicams izmantot tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm kairinošas (ANO *GHS* 2. vai 2.A kategorija) vai tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm viegli kairinošas (ANO *GHS* 2.B kategorija), jo ievērojams skaits ANO *GHS* 1. kategorijas ķimikāliju ar metodi klasificētas zemākā kategorijā — ANO *GHS* 2., 2.A vai 2.B kategorijā, bet ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas ir klasificētas augstākā kategorijā — 2., 2.A vai 2.B kategorijā (2) (3). Šim nolūkam var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

Visās procedūrās ar liellopu acīm un liellopu radzenēm testēšanas iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (11).

Kaut arī *BCOP* testēšanas metodē neņem vērā konjunktīvas un varavīksnenes bojājumus, tajā apskata ietekmi uz radzeni, kas ir noteicošais faktors *in vivo* klasifikācijā, izmantojot ANO *GHS* klasifikāciju. Izmantojot *BCOP* testēšanas metodi, nevar *per se* novērtēt radzenes bojājumu atgriezeniskumu. Pamatojoties uz trušu acu pētījumu rezultātiem, ir ierosināts dažu veidu neatgriezeniskas ietekmes identificēšanai izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (12). Tomēr, lai izprastu, kā rodas ar sākotnējo ārkārtīgi nopietno bojājumu nesaistīta neatgriezeniska ietekme, ir nepieciešamas papildu zinātniskās zināšanas. Visbeidzot, izmantojot *BCOP* testēšanas metodi, nevar novērtēt ar acu eksponētību saistītas sistēmiskas toksicitātes potenciālu.

Šī testēšanas metode tiks periodiski atjaunināta, ņemot vērā jaunu informāciju un datus. Piemēram, gadījumos, kad nepieciešams pilnīgāk raksturot radzenes bojājumus, var potenciāli noderēt histopatoloģija. Kā aprakstīts ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 160 (13), lietotāji tiek mudināti saglabāt radzenes un sagatavot histopatoloģijas paraugus, kurus iespējams izmantot datubāzes izveidē un lēmuma pieņemšanas kritēriju pilnveidošanā, kas vēl vairāk uzlabotu šīs testēšanas metodes pareizību.

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 3. papildinājumā norādītās standartķimikālijas. Laboratorija šīs ķimikālijas var izmantot *BCOP* testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms *BCOP* testēšanas metodes datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

BCOP testēšanas metode ir organotipisks modelis, kas dod iespēju īslaicīgi saglabāt liellopu acs radzenes normālās fizioloģiskas un bioķīmiskas funkcijas *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās ķimikālijas radītos bojājumus novērtē, veicot radzenes apduļķošanās un gaismas caurlaidības izmaiņu kvantitatīvus mērījumus attiecīgi ar opacitometru un redzamās gaismas spektrofotometru. Abus mērījumus izmanto *IVIS* aprēķināšanai, pēc kura nosaka kairinājuma izraisīšanas bīstamības klasifikācijas kategoriju *in vitro*, ko izmanto testējamās ķimikālijas acu kairinājumu izraisīšanas potenciāla *in vivo* prognozēšanai (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji" 48. punktā).

BCOP testēšanas metodē tiek izmantotas izolētas tikko kautu liellopu acu radzenes. Radzenes apduļķošanos mēra kvantitatīvi kā radzenes gaismas caurlaidību. Radzenes caurlaidību mēra kvantitatīvi kā krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzumu, kas izgājis cauri visai radzenei un ko detektē aizmugurējā kamerā.

▼M7

Testējamo ķimikāliju aplicē uz radzenes epitēlija virsmas, to iepildot radzenes turētāja priekšējā kamerā. 4. papildinājumā dots *BCOP* testēšanas metodē izmantojamā radzenes turētāja apraksts un shēma. Radzenes turētājus var nopirkt gatavus no dažādiem piegādātājiem vai izgatavot pašu spēkiem.

Liellopu acu avots un vecums un izmantojamo dzīvnieku sugas izvēle

Uz kautuvēm nosūtītos liellopus parasti kauj izmantošanai patēriņam cilvēku pārtikā vai citām komerciālām vajadzībām. *BCOP* testa metodē vajadzīgo radzeņu iegūšanai izmanto tikai veselīgus dzīvniekus, ko uzskata par piemērotiem cilvēku pārtikai. Liellopu svars var ievērojami atšķirties atkarībā no šķirnes, vecuma un dzimuma, tāpēc netiek noteikts ieteicamais dzīvnieka svars kaušanas laikā.

Ja tiek izmantotas dažāda vecuma dzīvnieku acis, to radzeņu izmēri var atšķirties. No liellopiem, kas vecāki par astoņiem gadiem, parasti iegūst radzenes, kuru diametrs horizontāli ir > 30,5 mm un kuru biezums centrā (*CCT*) ir ≥ 1100 μm, savukārt no liellopiem, kas ir jaunāki par pieciem gadiem, parasti iegūst radzenes, kuru diametrs horizontāli ir < 28,5 mm un *CCT* < 900 μm (14). Šā iemesla dēļ tāpēc parasti neizmanto par 60 mēnešiem vecāku liellopu acis. Parasti neizmanto arī par 12 mēnešiem jaunāku liellopu acis, jo tās vēl attīstās un to radzenes biezums un diametrs ir ievērojami mazāki nekā pieaugušu liellopu acīm. Taču izmantot jaunlopu (t. i., 6 līdz 12 mēnešus vecu) radzenes ir pieļaujami, jo tām ir dažas priekšrocības, piem., lielāka pieejamība, mazs vecuma diapazons un mazāks risks, ka darbinieki varētu tikt eksponēti govju sūkļveida encefalopātijai (15). Tā kā būtu lietderīgi sīkāk novērtēt, kā radzenes lielums vai biezums ietekmē tās reakciju uz korozīvu un kairinošu ķimikāliju iedarbību, lietotāji tiek rosināti norādīt to dzīvnieku aptuveno vecumu un/vai svaru, no kuriem ņemtas pētījumā izmantotās radzenes.

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

Acis ņem kautuvju darbinieki. Lai pēc iespējas ierobežotu acu mehāniskos un cita veida bojājumus, acis enukleē iespējami drīz pēc dzīvnieka nonāvēšanas un nekavējoties pēc enukleācijas un transportēšanas laikā atdzesē. Lai novērstu acu eksponētību potenciāli kairinošām ķimikālijām, kautuvju darbinieki dzīvnieka galvas skalošanai nedrīkst izmantot detergentus.

Acis pilnīgi iegremdē atdzesētā Henksa šķīdumā (*Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS*) piemērota izmēra konteinerā un nogādā laboratorijā tā, lai pēc iespējas ierobežotu to bojāšanos un/vai bakteriālo kontamināciju. Tā kā acis tiek ņemtas kaušanas laikā, tās var būt eksponētas asinīm un citiem bioloģiskiem materiāliem, kā arī baktērijām u. c. mikroorganismiem. Tāpēc ir svarīgi pēc iespējas samazināt kontaminācijas risku (piem., acu ņemšanas un transportēšanas laikā konteineru ar acīm turot uz parastā ledus un Henksa šķīdumam, kurā acis atrodas transportēšanas laikā, pievienojot antibiotikas [piem., penicilīnu koncentrācijā 100 IU/ml un streptomicīnu koncentrācijā 100 μg/ml]).

Pēc iespējas saīsina laiku no acu ņemšanas līdz radzeņu izmantošanai *BCOP* testa metodē (parasti acis ņem un radzenes izmanto tajā pašā dienā), un uzskatāmi parāda, ka tam nav ietekmes uz testēšanas rezultātiem. Šo rezultātu pamatā ir acu izvēles kritēriji, kā arī pozitīvās un negatīvās kontroles atbildreakcijas. Visām testēšanai izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemtu acu grupas.

***BCOP* testēšanas metodē izmantoto acu izvēles kritēriji**

Pēc acu nonākšanas laboratorijā uzmanīgi pārbauda, vai tām nav defektu, tostarp palielinātas duļķainības, skrambu vai neovaskularizācijas. Jāizmanto tikai tādu acu radzenes, kam šādu defektu nav.

▼M7

Vēlāk testēšanas procesā novērtē arī katras radzenes kvalitāti. Nav derīgas radzenes, kuru apduļķojuma rādītājs pēc sākotnējā vienas stundas līdzsvarošanās perioda ir septiņas apduļķošanās vienības vai vairāk (PIEZĪME: opacitometrs jākalibrē ar duļķainības standartiem, kurus izmanto apduļķošanās vienību noteikšanai, sk. 4. papildinājumu).

Katrā apstrādes grupā (testējamā ķimikālija, paralēlās negatīvās un pozitīvās kontroles) jābūt vismaz trīs acīm. *BCOP* testēšanas metodes negatīvajai kontrolei izmanto trīs radzenes. Tā kā visas radzenes izņem no acābola un nostiprina radzeņu kamerās, ir iespējami atsevišķu radzeņu apduļķošanās un caurlaidības rādītāju artefakti no manipulācijām ar tām (tostarp negatīvajā kontrolē). Turklāt, veicot *IVIS* aprēķinus, negatīvās kontroles radzeņu apduļķošanās un caurlaidības vērtības izmanto to radzeņu apduļķošanās un caurlaidības vērtību korekcijai, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju un izmanto pozitīvajai kontrolei.

PROCEDŪRA

Acu sagatavošana

Nebojātas radzenes izpreparē kopā ar 2–3 mm platu cīpslenes daļu, lai atvieglotu turpmākās operācijas, uzmanoties nesabojāt radzenes epitēliju un endotēliju. Izolētās radzenes nostiprina šim nolūkam paredzētos radzenes turētājos, kas sastāv no priekšējā un aizmugurējā nodalījuma, kuri saskaras attiecīgi ar radzenes epitēlija un endotēlija virsmu. Abas kameras (vispirms aizmugurējo kameru) tā, lai neveidotos burbuļi, pilnīgi piepilda ar fenolsarkano nesaturošu siltu Īgla barotni (*Eagle's Minimum Essential Medium*, *EMEM*). Pēc tam vismaz vienu stundu ierīci iztur pie 32 ± 1 °C, lai radzene būtu līdzsvarota attiecībā pret barotni un iespēju robežās tiktu panākta normāla metaboliskā aktivitāte (radzenes virsmas temperatūra *in vivo* ir apmēram 32 °C).

Pēc līdzsvarošanas perioda abās kamerās iepilda svaigu, iepriekš uzsildītu fenolsarkano nesaturošu *EMEM* un katrai radzenei nolasa sākotnējās apduļķošanās rādījumus. Radzenes, kam tiek konstatēti makroskopiski audu bojājumi (piem., skrambas, pigmentācija, neovaskularizācija) vai kuru apduļķošanās rādītājs ir lielāks par septiņām apduļķošanās vienībām vai attiecīgajam opacitometra un izmantoto radzenes turētāju ekvivalentam, nav derīgas. Vismaz trīs radzenes izmanto negatīvajai (vai šķīdinātāja) kontrolei. Pārējās radzenes iedala apstrādes un pozitīvās kontroles grupās.

Tā kā ūdens siltumietilpība ir lielāka par gaisa siltumietilpību, ūdens nodrošina stabilākus temperatūras apstākļus inkubācijai. Tāpēc radzenes turētāja un tā satura uzturēšanai 32 ± 1 °C temperatūrā ieteicams izmantot ūdens vannu. Taču var izmantot arī inkubatorus ar gaisu, ja tiek veikti temperatūras stabilitātes uzturēšanai vajadzīgie pasākumi (piem., turētāju un barotnes iepriekšēja sasildīšana).

Testējamās ķimikālijas ievadīšana

Izmanto divus dažādus apstrādes protokolus, vienu šķidrumiem un virsmaktīvām vielām (cietvielām vai šķidrumiem), bet otru cietvielām, kas nav virsmaktīvas.

Šķidrumus testē neatšķaidītus. Pusšķidrus, krēmveida un vaskveida materiālus parasti testē kā šķidrumus. Neatšķaidītas virsmaktīvās vielas testē 10 % (masas) koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumā, destilētā ūdenī vai citā šķīdinātājā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nelabvēlīgas ietekmes uz testēšanas sistēmu. Ja izmanto citu atšķaidīšanas koncentrāciju, tas ir attiecīgi

▼M7

jāpamato. Virsmaktīvās vielas saturošus maisījumus var testēt neatšķaidītus vai atšķaidītus līdz attiecīgai koncentrācijai, atkarībā no *in vivo* ekspozīcijas scenārija. Testētās koncentrācijas izvēle ir pienācīgi jāpamato. Šķidrumiem un virsmaktīvām vielām radzenes eksponē 10 minūtes. Ja izmanto citu ekspozīcijas laiku, tam jāsniedz pienācīgs zinātnisks pamatojums. Virsmaktīvas vielas un virsmaktīvu vielu saturoša maisījuma definīcija sniegta 1. papildinājumā.

Cietvielas, kas nav virsmaktīvas, parasti testē šķīdumu vai suspensiju veidā 20 % (masas) koncentrācijā 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumā, destilētā ūdenī vai citā šķīdinātājā, par kuriem ir iegūtas liecības, ka tiem nav nevēlamas ietekmes uz testa sistēmu. Zināmos apstākļos ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu cietvielas var testēt tīrā veidā, izmantojot vaļējās kameras metodi (sk. 32. punktu), tās tieši aplicējot uz radzenes virsmas. Cietvielām radzenes eksponē četras stundas, taču, tāpat kā šķidrumu un virsmaktīvu vielu gadījumā, ar pienācīgu zinātnisku pamatojumu drīkst izmantot citu ekspozīcijas laiku.

Atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām (piem., cietviela, šķidrums, viskozs vai neviskozs šķidrums) var izmantot dažādas apstrādes metodes. Galvenais ir nodrošināt, lai testējamā ķimikālija pienācīgi pārklātu epitēlija virsmu un skalojot tiktu pienācīgi noskalota. Slēgtās kameras metodi parasti izmanto neviskozām vai nedaudz viskozām šķidrām testējamām ķimikālijām, bet vaļējās kameras metodi parasti izmanto daļēji viskozām un viskozām šķidrām testējamajām ķimikālijām un cietvielām tīrā veidā.

Izmantojot slēgtās kameras metodi, pietiekamu daudzumu testējamās ķimikālijas (750 µL), lai tiktu pārklāta radzenes epitēlija virsma, ievieto priekšējā kamerā pa dozēšanas atverēm kameras augšpusē un atveres pēc tam uz ekspozīcijas laiku noslēdz ar kameras aizbāžņiem. Svarīgi ir nodrošināt, lai katra radzene tiktu eksponēta testējamai ķimikālijai atbilstošu laiku.

Izmantojot vaļējās kameras metodi, pirms apstrādes noņem priekšējās kameras lodziņa slēggredzenu un pašu stikla lodziņu. Kontroles vai testējamo ķimikāliju (750 µL vai tādu testējamās ķimikālijas daudzumu, ar ko var pilnīgi noklāt radzeni) aplicē tieši uz radzenes epitēlija virsmas ar mikropipeti. Ja testējamo ķimikāliju dozēt ar pipeti ir grūti, to var zem spiediena iepildīt pozitīvās izspiedes pipetē [*positive displacement pipet*], lai dozēt būtu vieglāk. Pozitīvās izspiedes pipetes uzgali ievieto šļirces dozēšanas uzgalī, lai spiediena iedarbības rezultātā materiālu varētu iespiest dozēšanas uzgalī. Vienlaikus, pipetes virzulim pārvietojoties augšup, nospiež šļirces virzuli. Ja pipetes uzgalī parādās gaisa burbuļi, testējamo ķimikāliju izņem (izspiež) un procesu atkārto, kamēr uzgalis ir pilns un tajā nav gaisa burbuļu. Ja vajadzīgs, var izmantot parastu šļirci (bez adatas), jo ar to var izmērīt precīzu testējamās ķimikālijas tilpumu un vielu ir vieglāk uzklāt radzenes epitēlija virsmai. Pēc aplicēšanas priekšējai kamerai ieliek stikla lodziņu, lai atkal izveidotu noslēgtu sistēmu.

Pēcekspozīcijas inkubēšana

Pēc ekspozīcijas perioda testējamo, negatīvās kontroles vai pozitīvās kontroles ķimikāliju izņem no priekšējās kameras un epitēliju vismaz trīs reizes (vai kamēr vairs nav vizuāli novērojamas testējamās ķimikālijas paliekas) noskalo ar *EMEM* (kas satur fenolsarkano). Skalošanai barotni, kurā ir fenolsarkanais, izmanto tāpēc, ka var novērot fenolsarkanā krāsas izmaiņas, lai noteiktu, cik sekmīgi noskalotas skābas vai sārmainas testējamās ķimikālijas. Ja fenolsarkanais joprojām maina krāsu (uz dzeltenu vai violetu) vai ja ir redzamas testējamās ķimikālijas atliekas, radzenes skalo vairāk nekā trīs reizes. Kad barotnē vairs

▼M7

nav testējamās ķimikālijas, radzenes pēdējo reizi noskalo ar *EMEM* (bez fenolsarkanā). Pēdējā skalošanas reizē *EMEM* (bez fenolsarkanā) izmanto tāpēc, lai pirms apduļķošanās mērīšanas noskalotu fenolsarkano no priekšējās kameras. Pēc tam priekšējo kameru no jauna piepilda ar svaigu *EMEM*, kas nesatur fenolsarkano.

Testējot šķidrumus vai virsmaktīvas vielas, pēc skalošanas radzenes vēl divas stundas inkubē 32 ± 1 °C temperatūrā. Zināmos apstākļos var būt noderīgs ilgāks pēcekspozīcijas laiks, bet to izlemj katrā gadījumā atsevišķi. Ar cietvielām apstrādātas radzenes pēc četras stundas ilgā ekspozīcijas perioda beigām rūpīgi noskalo, bet tām nav vajadzīga papildu inkubācija.

Pēc pēcekspozīcijas inkubācijas perioda beigām šķidrumu un virsmaktīvu vielu gadījumā un pēc četru stundu ilgās ekspozīcijas nevirsmaktīvo cietvielu gadījumā reģistrē katras radzenes apduļķošanos un caurlaidību. Katru radzeni apskata un reģistrē novērojumus (piem., audu lobīšanās, testējamās ķimikālijas atliekas, nevienmērīgas apduļķošanās pazīmes). Šie novērojumi var būt svarīgi, jo ar tiem var būt izskaidrojamas opacitometra rādījumu atšķirības.

Kontroles ķimikālijas

Katrā eksperimentā iekļauj paralēlās negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.

Testējot vielu, kas ir 100 % šķidrums, *BCOP* testēšanas metodē paralēli iekļauj negatīvo kontroli (piem., 0,9 % nātrija hlorīda šķīdumu vai destilētu ūdeni), lai varētu konstatēt neraksturīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un iegūtu testa beigupunktu sākumvērtības. Tas arī ļauj pārliecināties, ka kairinājuma atbildreakciju neizraisa testa apstākļi.

Testējot atšķaidītu šķidrumu, virsmaktīvo vielu vai cietvielu, *BCOP* testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontrolgrupu, lai varētu konstatēt nerakstūrīgas testēšanas sistēmas izmaiņas un noteikt testa beigupunktu bāzlīnijas vērtības. Drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru iegūtas liecības, ka tam nav nevēlamas ietekmes uz testēšanas sistēmu.

Lai verificētu testa sistēmas integritāti un tās pareizu darbību, katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj ķimikāliju, par kuru zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Tomēr, lai varētu novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, kairinājuma atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārmērīgi liela.

Piemēri šķidru testējamo ķimikāliju pozitīvajām kontrolēm ir 100 % etanols vai 100 % dimetilformamīds. Piemērs cietu testējamo ķimikāliju pozitīvajām kontrolēm ir 20 % (masas) imidazola 0,9 % nātrija hlorīda šķīduma.

Etalonķimikālijas palīdz novērtēt nezināmas konkrētas ķimikāliju vai produktu kategorijas ķimikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai novērtēt acu kairinātāja salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes kairinājuma atbildreakciju.

Mērāmie beigupunkti

Apduļķojumu nosaka pēc radzenes gaismas caurlaidības. Radzenes apduļķojumu mēra kvantitatīvi ar opacitometru, iegūstot apduļķošanās vērtības nepārtrauktā skalā

Caurlaidību nosaka pēc krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzuma, kas iziet cauri visiem radzenes šūnu slāņiem (t. i., no epitēlija uz radzenes ārējās virsmas līdz endotēlijam uz radzenes iekšējās virsmas). Radzenes turētāja priekšējā kamerā, kas saskaras ar radzenes epitēlija virsmu, iepilda vienu ml nātrija fluoresceīna šķīduma (attiecīgi 4 vai 5 mg/ml, testējot šķidrumus un virsmaktīvas vielas vai cietvielas, kas nav virsmaktīvas), savukārt aizmugurējo kameru, kas saskaras ar

▼M7

radzenes endotēlija virsmu, piepilda ar svaigu *EMEM*. Pēc tam turētāju horizontālā stāvoklī uz 90 ± 5 min inkubē 32 ± 1 °C temperatūrā. Izmantojot UV/VIS spektrofotometriju, kvantitatīvi izmēra nātrija fluoresceīna daudzumu, kas nonāk aizmugurējā kamerā. Spektrofotometriskos mērījumus pie 490 nm reģistrē kā optiskā blīvuma (OD490) vai absorbcijas vērtības, ko mēra nepārtrauktā skalā. Fluoresceīna caurlaidības vērtības nosaka, izmantojot OD490 vērtības, pamatojoties uz redzamās gaismas spektrofotometru ar standarta 1 cm optiskā ceļa garumu.

Var izmantot arī 96 iedobju mikrotitrēšanas plati, ja i) var noteikt fluoresceīna OD490 vērtību noteikšanai izmantotā plates lasītāja lineāro diapazonu un ii) 96 iedobju platē izmantoti pareiza tilpuma fluoresceīna paraugi, lai iegūtu OD490 vērtības, kas ekvivalentas standarta 1 cm optiskā ceļa garumam (tam var būt vajadzīga pilnīgi pilna iedobe [parasti 360 µl]).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

Pēc apduļķošanās un vidējo caurlaidības (OD490) vērtību korekcijas, ņemot vērā fona apduļķošanās un negatīvās kontroles caurlaidības OD490 vērtības, lai katrai apstrādes grupai aprēķinātu *in vitro* kairinājuma rādītāju (*IVIS*), katras apstrādes grupas vidējās apduļķošanās un caurlaidības OD490 vērtības apvieno, izmantojot šādu empīriski iegūtu formulu:

IVIS = vidējā apduļķošanās vērtība + (15 × vidējā caurlaidības OD490 vērtība)

Sina et al. (16) norāda, ka šī formula ir iegūta iekšējos un starplaboratoriju pētījumos. Datiem, kas, izmantojot 36 savienojumus, iegūti vairāku laboratoriju veiktā pētījumā, tika veikta daudzfaktoru analīze, lai iegūtu vienādojumu, kas vislabāk apraksta *in vivo* un *in vitro* datu savstarpējo sakarību. Šo analīzi veica divas atsevišķas zinātnieku grupas, iegūstot gandrīz identiskus vienādojumus.

Apduļķošanās un caurlaidības vērtības jānovērtē arī neatkarīgi viena no otras, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija inducējusi koroziju vai nopietnu kairinājumu ar tikai vienu no diviem beigupunktiem (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji").

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

Tālāk norādītas *IVIS* robežvērtības tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (ANO *GHS* 1. kategorija), un arī tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acīm kairinošas vai nopietnus acu bojājumus izraisošas (ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas).

IVIS	ANO *GHS*
≤ 3	Nekategorizēta
> 3; ≤ 55	Nav iespējams prognozēt
> 55	1. kategorija

Pētījuma pieņemamības kritēriji

Testu uzskata par pieņemamu, ja pozitīvajā kontrolē tiek iegūta *IVIS* vērtība, kas divkāršas standartnovirzes robežās sakrīt ar pašreizējo vēsturisko vidējo vērtību, kura jāatjaunina vismaz reizi trīs mēnešos vai, ja laboratorijā testēšanu veic

▼M7

reti (t. i., retāk nekā reizi mēnesī), ikreiz, kad veic pieņemamu testu. No negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles atbildreakcijām jāiegūst tādas apduļķošanās un caurlaidības vērtības, kas ir mazākas nekā iepriekšnoteiktās fona apduļķošanās un caurlaidības augstākās vērtības liellopu radzenēm, kas apstrādātas ar attiecīgo negatīvo vai šķīdinātāja/nesēja kontroli. Kad testējamās ķimikālijas klasifikācija ir viennozīmīga, vajadzētu pietikt ar vienu testēšanas reizi, kurā izmanto vismaz trīs radzenes. Tomēr, ja pirmajā testēšanas reizē iegūti neskaidri rezultāti, jāapsver iespēja testēšanu veikt vēlreiz (lai gan tas nav obligāti) un vēl arī trešo reizi, ja pirmajās divās reizēs iegūtas nesaderīgas vidējās *IVIS* vērtības. Šajā kontekstā pirmās testēšanas reizes rezultāti uzskatāmi par strīdīgiem, ja prognozes no 3 radzenēm bijušas nesaderīgas:

— prognozes no 2 no 3 radzenēm nesader ar visu 3 radzeņu vidējo prognozi VAI

— prognoze no 1 no 3 radzenēm nesader ar visu 3 radzeņu vidējo prognozi UN nesaderīgais rezultāts ir > 10 *IVIS* vienības no noteiktā sliekšņa 55.

— Ja atkārtotas testēšanas reize apstiprina sākotnējās testēšanas reizes prognozi (pamatojoties uz vidējo *IVIS* vērtību), tad galīgo lēmumu var pieņemt, neveicot turpmāku testēšanu. Ja atkārtotas testēšanas reizes rezultāts nesader ar sākotnējās testēšanas reizes prognozi (pamatojoties uz vidējo *IVIS* vērtību), tad jāveic trešā un pēdējā testēšanas reize, lai atrisinātu neskaidrās prognozes un testējamo ķimikāliju klasificētu. Ja kādā testēšanas reizē tiek prognozēta klasificēšana ANO *GHS* 1. kategorijā, var būt pieļaujami testēšanu klasificēšanai un marķēšanai neturpināt.

Testēšanas pārskats

Ja tā attiecas uz pētījuma norisi, testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamās un kontroles ķimikālijas

— Ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service* (*CAS*) izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi; *CAS* reģistra numurs (RN), ja tas ir zināms.

— Testējamās/kontroles ķimikālijas tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma norisi, piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī.

— Testējamo/kontroles ķimikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese.

Testēšanas metodes apstākļi

— Izmantotais opacitometrs (piem., modelis un specifikācijas) un instrumentu iestatījumi.

— Informācija par apduļķošanās un caurlaidības mērierīču (piemēram, opacitometra un spektrofotometra) kalibrēšanu, lai nodrošinātu mērījumu linearitāti.

— Izmantotā radzenes turētāja tips (piemēram, modelis un specifikācijas).

▼M7

— Cita izmantotā aprīkojuma apraksts.

— Procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t. i., pareizību un ticamību) laikā (piem., periodiska standartķimikāliju testēšana).

Testa pieņamamības kritēriji

— Pieņemams paralēlo pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātu diapazons, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem.

— Ja vajadzīgs, pieņemami paralēlo etalonkontroļu diapazoni, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem.

Acu ņemšana un sagatavošana

— Norāde par acu ņemšanas vietu (t. i., iestāde, kur tās ņemtas).

— Radzenes diametrs, kas liecina par izcelsmes dzīvnieka vecumu un piemērotību testam.

— Acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piem., acu ņemšanas datums un laiks, līdz testēšanas sākumam pagājušais laiks, transportēšanas veids un temperatūra, izmantotās antibiotikas, ja tādas izmantotas).

— Liellopu radzeņu sagatavošana un nostiprināšana, tostarp ziņas par to kvalitāti, radzenes turētāju temperatūra un testēšanā izmantoto radzeņu atlases kritēriji.

Testa procedūra

— Izmantoto replikātu skaits.

— Izmantoto negatīvo un pozitīvo kontroļu (attiecīgā gadījumā arī šķīdinātāja kontroļu un etalonkontroļu) identitāte.

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācija(-s), aplicēšana, ekspozīcijas laiks un pēcekspozīcijas inkubācijas periods.

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts.

— Izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts.

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

— Izmantoto lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts.

Rezultāti

— Tabulas veidā apkopoti dati par katru testējamo paraugu (piem., apduļķošanās un OD490 vērtības un aprēķinātais testējamās ķimikālijas *IVIS*, un pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un etalonkontroles [ja tādas bijušas], attiecīgā gadījumā arī dati no atkārtotiem eksperimentiem un katra eksperimenta vidējā vērtība ± standartnovirze).

— Jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts.

— Iegūtā *in vitro* ANO *GHS* klasifikācija (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

▼**M7**

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Pieejams: [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. Pieejams: [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. Pieejams: [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: ICCVAM 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) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Pieejams: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – 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) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Pieejams: [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. Pieejams: [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) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(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. Pieejams: [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 (revised in 1997).

Pieejams: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs(-i) un uzticams(-i) ieguves avots(-i); (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo ķimikāliju klasi, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem ietekmes veidiem un (v) zināma potence vēlamās atbildreakcijas diapazonā.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietna acu bojājuma izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (pozitīvs rezultāts).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes apduļķojums: izmērītā radzenes apduļķošanās pakāpe pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes apduļķojuma palielināšanās liecina par radzenes bojājumiem. Apduļķojumu var novērtēt subjektīvi, piem., Dreiza testā ar truša acīm, vai objektīvi — ar instrumentu, piem., opacitometru.

Radzenes caurlaidība: kvantitatīvs radzenes epitēlija bojājumu mērījums, kuru izdara, nosakot krāsvielas nātrija fluoresceīna daudzumu, kas iziet cauri visām radzenes šūnu kārtām.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un "ANO *GHS* 2. kategorija" (4).

Pseidonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***In vitro* kairinājuma rādītājs (*IVIS*)**: pēc empīriski iegūtas formulas aprēķināts rādītājs, kuru izmanto *BCOP* testēšanas metodē un kurā katras apstrādes grupas vidējā apduļķošanās vērtība un vidējā caurlaidības vērtība tiek apkopota vienā *in vitro* rezultātā katrai apstrādes grupai. *IVIS* = vidējā apduļķošanās vērtība + (15 x vidējā caurlaidības vērtība).

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Nopietni acu bojājumi".

▼M7

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (4).

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma (ANO *GHS* 2., 2.A vai 2.B kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO *GHS* 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko "ANO *GHS* nekategorizētas ķimikālijas".

Opacitometrs: instruments, ar ko mēra radzenes apduļķojumu, kvantitatīvi izvērtējot radzenes gaismas caurlaidību. Instrumentam parasti ir divi nodalījumi, katram savs gaismas avots un fotoelements. Vienā nodalījumā ievieto apstrādāto radzeni, bet otru izmanto instrumenta kalibrēšanai un nulles vērtību iestatīšanai. Halogēnlampas gaisma, kas iet cauri kontroles nodalījumam (tukša kamera bez lodziņiem un šķidruma), krītot uz fotoelementu, tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu, izejot cauri nodalījumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta abu fotoelementu uztvertās gaismas vērtību starpība un uz digitālā displeja attēlota skaitliska apduļķošanās vērtība.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Acu kairinājums".

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību tajā pašā laboratorijā un dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājums vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un "ANO *GHS* 1. kategorija" (4).

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Viela: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (4).

▼M7

Virsmaktīva viela: saukta arī par virsmaktīvu aģentu, ir viela, piem., detergents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju.

Virsmaktīvu vielu saturošs maisījums: šīs testēšanas metodes kontekstā tas ir maisījums, kas satur vienu vai vairākas virsmaktīvas vielas galīgajā koncentrācijā > 5 %.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO *GHS*): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (4).

ANO *GHS* 1. kategorija: sk. “Nopietni acu bojājumi”.

ANO *GHS* 2. kategorija: sk. “Acu kairinājums”.

ANO *GHS* nekategorizētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras neatbilst kritērijiem klasificēšanai ANO *GHS* 1. vai 2. (2.A vai 2.B) kategorijā. Nozīmē to pašu, ko “neklasificētas ķimikālijas”.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķimikālijas bīstamības potenciālu.

▼M7

2. papildinājums

BCOP TESTĒŠANAS METODES PROGNOZĒTSPĒJA

1. tabula

BCOP prognozētspēja tādu ķimikāliju identificēšanā, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus [ANO *GHS* / ES CLP, 1. kat. vai nav 1. kat. (2. kat.+nekat.); ASV *EPA* I kat. vai nav I kat. (II kat.+III kat.+IV kat.)]

Klasifikācijas sistēma	Sk.	Pareizība		Jutība		Pseidonegatīvi rezultāti		Specifiskums		Pseidopozitīvi rezultāti	
		%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.
ANO *GHS* ES *CLP*	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
ASV *EPA*	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

2. tabula

BCOP prognozētspēja tādu ķimikāliju identificēšanā, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas ("nekairinātājas") [ANO *GHS* / ES CLP, nekat. vai nav nekat. (1. kat.+2. kat.); ASV *EPA* IV kat. vai nav IV kat. (I kat.+II kat.+III kat.)]

Klasifikācijas sistēma	Sk.	Pareizība		Jutība		Pseidonegatīvi rezultāti		Specifiskums		Pseidopozitīvi rezultāti	
		%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Sk.	%	Nr.
ANO *GHS* ES *CLP*	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
ASV *EPA*	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

3. papildinājums

BCOP TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶIMIKĀLIJAS

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 13 ķimikālijām. Šīs ķimikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu acu apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (*TG* 405) (17) un ANO *GHS* klasifikācijas sistēma (t. i., 1., 2.A, 2.B kategorija vai neklasificētas ķimikālijas) (4). Citi atlases kritēriji bija ķimikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsauces datu pieejamība un kvalitatīvu ar *BCOP* testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Atsauces dati ir pieejami vienkāršotajā kopsavilkumā (3) un *ICCVAM* papildinformācijas pārskata dokumentā par *BCOP* testēšanas metodi (2) (18).

1. tabula

Ķimikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot *BCOP* testēšanas metodi

Ķimikālija	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregātstāvoklis	In vivo klasifikācija ([2])	*BCOP* klasifikācija
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidrs	1. kategorija	1. kategorija
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amidīns	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābe, esteris	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Imidazols	288-32-4	Heterocikliski savienojumi	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Trihloretiķskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidrs	1. kategorija	1. kategorija
2,6-Dihlorobenzoilhlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidrs	2.A kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketons, esteris	Šķidrs	2.B kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganisks sāls	Ciets	2. ([3]) kategorija	Nav iespējams pareizi/ticami prognozēt
EDTA dikālija sāls	25102-12-9	Amīns, karbonskābe (sāls)	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts
Tween 20	9005-64-5	Esteris, poliēters	Šķidrs	Neklasificēts	Neklasificēts
2-merkaptopirimidīns	1450-85-7	Acilhalogenīds	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts
Fenilbutazons	50-33-9	Heterociklisks savienojums	Ciets	Neklasificēts	Neklasificēts

▼**M7**

Ķimikālija	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregātstāvoklis	In vivo klasifikācija ([2])	*BCOP* klasifikācija
Polioksietilēna 23 laurilēteris (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Spirts	Šķidrs	Neklasificēts	Neklasificēts

Saīsinājumi: *CAS* Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

([1]) Katra testējamā ķimikālija ķimikāliju klasē iekļauta, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Pamatojoties uz truša acu in vivo testa rezultātiem (ESAO TG 405) (17) un izmantojot ANO GHS sistēmu (4).

([3]) Klasificēšana 2.A vai 2.B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2.A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. In vivo pētījums ietvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai ātrāk saruka līdz nullei. Vienam dzīvniekam, kurš pilnīgi neatlaba līdz 7. dienai, konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1 (7. dienā), bet 10. dienā tas pilnīgi izzuda.

▼M7

4. papildinājums

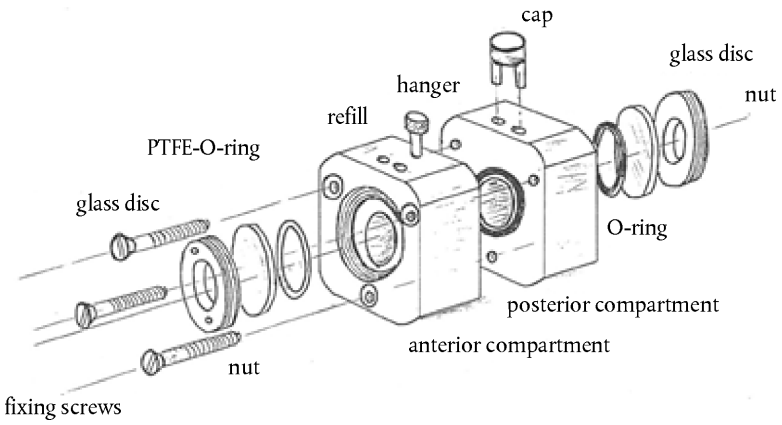
BCOP RADZENES TURĒTĀJS

BCOP radzenes turētāji ir izgatavoti no inerta materiāla (piem., polipropilēna). Turētājs sastāv no divām pusēm (priekšējā un aizmugurējā kamera), un tam ir divas līdzīgas cilindriskas iekšējās kameras. Katra kamera ir konstruēta tā, lai tās tilpums būtu aptuveni 5 ml, un tās galā ir stikla lodziņš, caur kuru reģistrē apduļķojuma mērījumus. Katras iekšējās kameras diametrs ir 1,7 cm un dziļums 2,2 cm ([1]). Lai nepieļautu noplūdes, aizmugurējai kamerai uzliek gredzenveida blīvi. Radzeni novieto ar endotēlija pusi uz leju pret aizmugurējās kameras blīvi, un priekšējo kameru novieto uz radzenes epitēlija virsmas. Kameras vietā notur trīs nerūsoša tērauda skrūves kameras ārmalā. Lai nodrošinātu vieglu piekļuvi radzenei, katras kameras galā ir noņemams stikla lodziņš. Lai nepieļautu noplūdes, arī starp stikla lodziņu un kameru ir blīve. Barotnes un testējamo ķimikāliju ievadīšanai un izvadīšanai ir paredzētas divas atveres katras kameras augšpusē. Iedarbības un inkubācijas perioda laikā tās noslēdz ar gumijas tapām. Radzenes turētāju gaismas caurlaidība var mainīties, jo gaismas izkliedi vai atstarojumu var ietekmēt nolietojums vai noteiktu ķimikāliju atlieku uzkrāšanās uz iekšējās kameras sieniņām vai stikla lodziņiem. Tā rezultātā var palielināties vai samazināties radzenes turētāju bāzlīnijas gaismas caurlaidība (un līdz ar to attiecīgi samazināties vai palielināties bāzlīnijas apduļķojuma rādījumi) un var būt novērojamas būtiskas izmaiņas paredzētajos sākotnējos radzenes apduļķojuma bāzlīnijas mērījumos atsevišķās kamerās (t. i., sākotnējās radzenes apduļķojuma vērtības konkrētos atsevišķos radzenes turētājos no gaidītajām bāzlīnijas vērtībām bieži var atšķirties par vairāk nekā 2 vai 3 apduļķojuma vienībām). Katrai laboratorijai atkarībā no testēto ķimikāliju veida un kameru izmantošanas biežuma jāapsver, vai nav jāizveido programma radzenes turētāju gaismas caurlaidības izmaiņu izvērtēšanai. Lai noteiktu bāzlīnijas vērtības, radzenes turētājus var pirms parastās izmantošanas pārbaudīt, izmērot apduļķojuma (vai gaismas caurlaidības) bāzlīnijas vērtības kamerām, kuras ir piepildītas ar pilnīgu barotni bez radzenēm. Pēc tam periodiski pārbauda radzenes turētāju gaismas caurlaidības izmaiņas izmantošanas perioda laikā. Katra laboratorija var noteikt radzenes turētāju pārbaudes biežumu atkarībā no testētajām ķimikālijām, izmantošanas biežuma un radzenes apduļķojuma bāzlīnijas vērtību izmaiņu novērojumiem. Ja ir novērojamas ievērojamas radzenes turētāja gaismas caurlaidības izmaiņas, jāapsver iespēja radzenes turētāju iekšējās virsmas pienācīgi notīrīšanas un/vai nopulēt vai tās nomainīt.

([1]) Norādītie izmēri attiecas uz radzenes turētāju, kas paredzēts 12 līdz 60 mēnešus vecu govju acīm. Ja izmanto 6 līdz 12 mēnešus vecu dzīvnieku acis, abu turētāja kameru tilpumam jābūt 4 ml, bet abu iekšējo kameru diametram 1,5 cm un dziļumam 2,2 cm. Katra jaunas konstrukcijas radzenes turētāja gadījumā ir ļoti svarīgi, lai eksponētā radzenes virsmas laukuma attiecība pret aizmugurējās kameras tilpumu būtu tāda pati kā standarta radzenes turētājam. Tas ir vajadzīgs, lai tiktu pareizi noteiktas caurlaidības vērtības, kas izmantojamas *IVIS* aprēķināšanai ar piedāvāto formulu.

▼M7

Radzenes turētājs: izvērsta diagramma.



▼M7

5. papildinājums

OPACITOMETRS

Opacitometrs ir gaismas caurlaidības mērierīce. Piemēram, *BCOP* testēšanas metodes validēšanā izmantotajā *Electro Design* (Rioma, Francija) OP-KIT aprīkojumā halogēnlampas gaisma, kas iet cauri kontroles nodalījumam (tukša kamera bez lodziņiem un šķidruma), krītot uz fotoelementu, tiek salīdzināta ar gaismu, kas krīt uz fotoelementu, izejot cauri nodalījumam, kurā ir kamera ar radzeni. Tiek salīdzināta abu fotoelementu uztvertās gaismas vērtību starpība un uz digitālā displeja attēlota skaitliska apduļķošanās vērtība. Tiek noteiktas apduļķojuma vienības. Var izmantot citu veidu opacitometrus ar citādu konfigurāciju (piem., kuriem nav paralēli jāizdara kontroles un eksperimenta nodalījuma mērījumi), ja ir pierādīts, ka tie sniedz līdzīgus rezultātus kā validētais aprīkojums.

Opacitometra rādījumu grafikam visā apduļķojuma mērījumu diapazonā, kas aptver arī dažādo klasifikāciju robežvērtības prognozēšanas modelī (t. i., līdz robežvērtībai, pēc kuras nosaka koroziju / spēcīgu kairinājumu), jābūt lineāram. Lai nodrošinātu lineārus un precīzus rādījumus līdz 75–80 apduļķošanās vienībām, opacitometrs jākalibrē ar vairākiem kalibratoriem. Kalibratorus ievieto kalibrēšanas kamerā (radzenes kamera, kas paredzēta kalibratoriem) un opacitometrā nolasa rezultātus. Kalibrēšanas kamera ir izveidota tā, lai kalibrators atrastos apmēram tādā pašā attālumā no gaismas un fotoelementa, kādā apduļķošanās mērījumu laikā būtu novietota radzene. Atsauces vērtības un sākotnējie iestatījumi ir atkarīgi no izmantotā aprīkojuma veida. Ar pienācīgām (instrumentspecifiskām) procedūrām jānodrošina apduļķojuma mērījumu linearitāte. Piemēram, *Electro Design* (Rioma, Francija) OP-KIT aprīkojuma opacitometru vispirms kalibrē uz 0 apduļķojuma vienībām, izmantojot kalibrēšanas kameru bez kalibratora. Pēc tam pārmaiņus pa vienam kalibrēšanas kamerā ievieto trīs dažādus kalibratorus un mēra apduļķojumu. Apduļķojuma rādījumiem pie 1., 2. un 3. kalibratora ievietošanas jābūt attiecīgi 75, 150 un 225 apduļķojuma vienības ± 5 %.

▼M7

B.48. IZOLĒTAS VISTAS ACS TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ I) NOPIETNU ACU BOJĀJUMU INDUCĒTĀJAS ĶIMIKĀLIJAS UN II) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ PAR TĀDĀM, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 438 (2013. gads). Izolētas vistas acs (*ICE*) testēšanas metodi 2006. un 2010. gadā izvērtēja Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (*ICCVAM*) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*ECVAM*) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*JaCVAM*) (1) (2) (3). Pirmajā izvērtēšanā *ICE* tika atzīta par zinātniski derīgu testēšanas metodi izmantošanai par skrīninga testu tādu ķimikāliju (vielu un maisījumu) identificēšanai, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (1. kategorija), atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) (2) (4) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Otrajā izvērtēšanā *ICE* testēšanas metode tika izvērtēta attiecībā uz tās izmantošanu par skrīninga testu tādu ķimikāliju identificēšanā, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma un nopietnu acu bojājumu izraisītājas saskaņā ar ANO *GHS* (3) (4). Validācijas pētījuma rezultāti un profesionālvērtēšanas grupas ieteikumi apstiprināja sākotnējo ieteikumu *ICE* izmantot tam, lai klasificētu ķimikālijas, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO *GHS* 1. kategorija), jo pieejamā datu bāze kopš *ICCVAM* sākotnējās apstiprināšanas nebija mainījusies. Minētajā posmā netika ierosināti ieteikumi *ICE* pielietojamības jomu paplašināt, tajā ietverot arī citas kategorijas. Tika veikta validācijas pētījumā izmantotās *in vitro* un *in vivo* datu kopas atkārtota izvērtēšana, kuras mērķis bija izvērtēt *ICE* lietderīgumu tādu ķimikāliju identificēšanā, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem (5). Atkārtotajā izvērtēšanā tika secināts, ka *ICE* testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO *GHS* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (4) (5). Šajā testēšanas metodē ietilpst *ICE* testēšanas metodes ieteicamie lietojumi un ierobežojumi, kuru pamatā ir šie izvērtējumi. Galvenās atšķirības starp ESAO testēšanas norādījumu sākotnējo 2009. gada redakciju un atjaunināto 2013. gada redakciju attiecas uz (bet ne tikai) *ICE* testēšanas metodes izmantošanu tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē saskaņā ar ANO *GHS* klasifikācijas sistēmu, testēšanas pārskata elementu atjauninājumu, 1. papildinājuma — definīciju — atjauninājumu un 2. papildinājuma par standartķimikālijām atjauninājumu.

Šobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt Dreiza *in vivo* acu testu un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķimikāliju klasēm. Tomēr *in vivo* acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (6). Lejupējā pieeja (7) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķimikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls, savukārt augšupējā pieeja (7) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķimikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē. *ICE* testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, ko konkrētos apstākļos un ar noteiktiem ierobežojumiem, kas aprakstīti 8.–10. punktā, var izmantot tam, lai ķimikālijas klasificētu un marķētu kā acīm bīstamas. Kaut arī šo *ICE* testēšanas metodi vienu pašu

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼M7

neuzskata par derīgu aizstājēju trušu acu *in vivo* testam, to ieteicams izmantot par sākotnējo soli testēšanas stratēģijā, piemēram, *Scott et al.* (7) ierosinātajā lejupējā pieejā, lai identificētu ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, t. i., ķimikālijas, kuras bez papildu testēšanas jāklasificē ANO *GHS* 1. kategorijā (4). *ICE* testēšanas metodi ieteicams arī izmantot tam, lai identificētu ķimikālijas, kuras nav jāklasificē sakarā ar acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem, saskaņā ar ANO *GHS* (ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas) (4), tāpēc to var izmantot par sākotnējo soli augšupējā testēšanas stratēģijā (7). Taču, ja ar *ICE* testēšanas metodi netiek prognozēts, ka ķimikālija izraisa nopietnus acu bojājumus vai klasificējama par acu kairinājumu/nopietnu acu bojājumu izraisītāju, tā jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai noteiktu tās galīgo klasifikāciju. Turklāt pirms *ICE* izmantošanas augšupējā pieejā, izmantojot klasifikācijas shēmu, kas nav ANO *GHS*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm.

Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm, ko mēra ar tās spēju toksisku iedarboties uz enukleētu vistas aci. Toksisko ietekmi uz radzeni mēra ar šādiem parametriem: (i) kvalitatīvs apduļķošanās novērtējums, (ii) kvalitatīvs epitēlija bojājumu novērtējums, pamatojoties uz fluoresceīna aplicēšanu acij (fluoresceīna aizturēšana), (iii) kvantitatīvs biezuma palielināšanās (pietūkuma) novērtējums un (iv) kvalitatīvs makroskopisko morfoloģisko virsmas bojājumu novērtējums. Radzenes apduļķošanās, pietūkuma un bojājumu novērtējumu pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai novērtē atsevišķi un pēc tam apvieno, lai noteiktu acu kairinājuma klasifikāciju.

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šīs testēšanas metodes pamatā ir ESAO Norādījumu dokuments 160 (8), kas tika izstrādāts pēc *ICCVAM* starptautiskā validācijas pētījuma (1) (3) (9), kurā piedalījās Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs, Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs un *TNO* Dzīves kvalitātes nodaļas toksikoloģijas un praktiskās farmakoloģijas departaments (Nīderlande). Protokola pamatā ir informācija, kas iegūta no publicētiem protokoliem, kā arī *TNO* pašlaik izmantotā protokola (10) (11) (12) (13) (14).

Šīs testēšanas metodes validēšanā tika testēts plašs ķimikāliju klāsts, un validācijas pētījuma empīriskā datubāze aptvēra 152 ķimikālijas, tostarp 72 vielas un 80 maisījumus (5). Šī testēšanas metode ir izmantojama cietvielām, šķidrumiem, emulsijām un gēliem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi, cietvielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Validācijas pētījumā vēl nav novērtētas gāzes un aerosoli.

ICE testēšanas metodi var izmantot, lai identificētu acu nopietnu bojājumu izraisītājas ķimikālijas, t. i., ANO *GHS* 1. kategorijā klasificējamas ķimikālijas (4). Ja metodi izmanto šim nolūkam, konstatētie *ICE* testēšanas metodes ierobežojumi ir saistīti ar lielu pseidopozitīvu rezultātu īpatsvaru spirtam un lielu pseidonegatīvu rezultātu īpatsvaru cietvielām un virsmaktīvām vielām (1) (3) (9). Tomēr šajā kontekstā pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram (ANO *GHS* 1. kategorijas ķimikālija identificēta kā tāda, kas nav ANO *GHS* 1. kategorijas ķimikālija) nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas testējamās ķimikālijas, kuru testēšanā iegūst negatīvu rezultātu, pēc tam

▼M7

tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētu(-iem) *in vitro* testu(-iem) vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām. Jāpiemin, ka cietvielas Dreiza acu kairinājuma *in vivo* testā var izraisīt mainīgus un pārmērīgus ekspozīcijas apstākļus, kā rezultātā var rasties neatbilstošas prognozes par to patieso kairinājuma potenciālu (15). Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu visu veidu ķimikālijām, pozitīvu rezultātu pieņemot kā norādi uz nopietnus acu bojājumus izraisošu atbildreakciju, t. i., liecību, ka ķimikālija bez tālākas testēšanas jāklasificē ANO *GHS* 1. kategorijā. Taču spirtu testēšanā iegūti pozitīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi pārvērtēšanas riska dēļ.

Ja *ICE* testēšanas metodi izmanto tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO *GHS* 1. kategorija), tās vispārējā pareizība ir 86 % (120/140), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 6 % (7/113) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 48 % (13/27), salīdzinot ar datiem, kas iegūti ar truša acu *in vivo* testēšanas metodi un kas klasificēti atbilstīgi ANO *GHS* klasifikācijas sistēmai (4) (5).

ICE testēšanas metodi var izmantot arī tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO *GHS* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas. Pirms *ICE* izmantošanas augšupējā pieejā, izmantojot klasifikācijas shēmu, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm. Šo testēšanas metodi var izmantot visu veidu ķimikālijām, negatīvu rezultātu pieņemot par norādi, ka ķimikālija nav jāklasificē attiecībā uz acu kairinājumu vai nopietniem acu bojājumiem. Tomēr, pamatojoties uz vienu validācijas datubāzes rezultātu, krāsas, kuras satur organisku pretapaugšanas šķīdinātāju, var tikt prognozētas par zemu (5).

Ja *ICE* testēšanas metodi izmanto tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājumu un nopietnu acu bojājumu izraisītājas), tās vispārējā pareizība ir 82 % (125/152), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 33 % (26/79) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 1 % (1/73), salīdzinot ar datiem, kas iegūti pēc truša acu *in vivo* testēšanas metodes un kas klasificēti atbilstīgi ANO *GHS* klasifikācijas sistēmai (4) (5). Ja no datu bāzes izslēdz testējamās ķimikālijas, kuras ietilpst noteiktās klasēs (t. i., organisku pretapaugšanas šķīdinātāju saturošas krāsas), *ICE* testēšanas metodes vispārējā pareizība ANO *GHS* klasifikācijas sistēmā ir 83 % (123/149), pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars ir 33 % (26/78) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars ir 0 % (0/71) (4) (5).

ICE testēšanas metodi nav ieteicams izmantot tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras jāklasificē kā acīm kairinošas (t. i., ANO *GHS* 2. vai 2.A kategorija) vai kuras jāklasificē kā acīm viegli kairinošas (ANO *GHS* 2.B kategorija), jo ievērojams skaits ANO *GHS* 1. kategorijas ķimikāliju ar metodi ir klasificētas zemākā kategorijā — ANO *GHS* 2., 2.A vai 2.B kategorijā, bet ANO *GHS* nekategorizētās ķimikālijas ir klasificētas augstākā kategorijā — ANO *GHS* 2., 2.A vai 2.B kategorijā. Šim nolūkam var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

Visās procedūrās ar vistu acīm testējošajām iestādēm jāievēro piemērojamie noteikumi un procedūras darbībām ar cilvēku vai dzīvnieku izcelsmes materiāliem, pie kuriem pieder arī audi un audu šķidrumi. Ieteicams ievērot vispārējos piesardzības pasākumus darbam laboratorijā (16).

Kaut arī *ICE* testēšanas metode neņem vērā konjunktīvas un varavīksnenes bojājumus, ko izvērtē truša acu kairinājuma testēšanas metodē, tā apskata ietekmi uz radzeni, kas ir noteicošais faktors *in vivo* klasifikācijā, ja izmanto ANO *GHS* klasifikāciju. Kaut gan radzenes bojājumu atgriezeniskumu ar *ICE* testēšanas metodi novērtēt nevar, pamatojoties uz truša acu pētījumiem, ir ierosināts dažu

▼M7

neatgriezenisko ietekmes veidu novērtēšanai izmantot radzenes bojājuma sākotnējā dziļuma novērtējumu (17). Lai izprastu, kā rodas ar sākotnējo ārkārtīgi nopietno bojājumu nesaistīta neatgriezeniska ietekme, ir nepieciešamas papildu zinātniskās zināšanas. Visbeidzot, izmantojot *ICE* testēšanas metodi, nevar novērtēt ar acu eksponētību saistītas sistēmiskas toksicitātes potenciālu.

Šī testēšanas metode tiks periodiski atjaunināta, ņemot vērā jaunu informāciju un datus. Piemēram, gadījumos, kad nepieciešams pilnīgāk raksturot radzenes bojājumus, var potenciāli noderēt histopatoloģija. Lai šo iespējamību izvērtētu, lietotāji tiek mudināti acis saglabāt un sagatavot histopatoloģijas paraugus, kurus iespējams izmantot datubāzes izveidē un lēmuma pieņemšanas kritēriju pilnveidošanā, kas vēl vairāk uzlabotu šīs testēšanas metodes pareizību. ESAO ir izstrādājusi Norādījumu dokumentu par toksicitātes acīm *in vitro* testēšanas metožu izmantošanu, kas ietver sīki izklāstītas procedūras par histopatoloģijas paraugu ņemšanu un informāciju par to, kur paraugi un/vai histopatoloģijas dati jāiesniedz (8).

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 2. papildinājumā norādītās standartķimikālijas. Laboratorija šīs ķimikālijas var izmantot *ICE* testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms *ICE* testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

ICE testēšanas metode ir organotipisks modelis, kas dod iespēju īslaicīgi saglabāt vistas aci *in vitro*. Šajā testēšanas metodē testējamās ķimikālijas radītos bojājumus novērtē, nosakot radzenes pietūkumu, apduļķojumu un fluoresceīna aizturi. Divi pēdējie parametri tiek novērtēti kvalitatīvi, bet radzenes pietūkumu nosaka kvantitatīvi. Katru novērtējumu pārvērš kvantitatīvā rezultātā, ko izmanto, lai aprēķinātu kopējo kairinājuma rādītāju, vai tam piešķir kvalitatīvu kategoriju, ko izmanto, lai noteiktu acu *in vitro* apdraudējuma klasifikāciju vai klasificētu ANO *GHS* 1. kategorijā vai atzītu par ANO *GHS* neklasificējamu ķimikāliju. Jebkuru no šiem rezultātiem var izmantot, lai prognozētu, ka testējamā ķimikālija potenciāli varētu izraisīt nopietnus acu bojājumus *in vivo* vai ka tā attiecībā uz acu apdraudējumu nav klasificējama (sk. "Lēmuma pieņemšanas kritēriji"). Tomēr nevar klasificēt ķimikālijas, par kurām nav prognožu, ka tās izraisīs nopietnus acu bojājumus vai ka tās ir neklasificējamas, izmantojot *ICE* testēšanas metodi (sk. 11. punktu).

Vistu acu avots un vecums

Parasti šajā testā izmanto acis, kas ņemtas no kautuvē cilvēka patēriņam kautām vistām, tāpēc laboratorijas dzīvnieki nav jāizmanto. Izmanto tikai tādu veselīgu dzīvnieku acis, kurus uzskata par piemērotiem cilvēku pārtikai.

Kaut gan nav veikts kontrolēts pētījums vistu optimālā vecuma novērtēšanai, šajā testēšanas metodē parasti izmanto pavasara cāļus, kurus parasti apstrādā mājputnu kautuvē (t. i., aptuveni 7 nedēļas vecus, 1,5–2,5 kg).

Acu ņemšana un nogādāšana laboratorijā

Galvas atdala tūlīt pēc vistu apdullināšanas, parasti ar elektriskās strāvas triecienu, un asiņu nolaišanas pa griezumu kaklā. Jāizvēlas vietējs vistu sagādes avots, kas atrodas iespējami tuvu laboratorijai, lai vistu galvas no kautuves varētu nogādāt laboratorijā tik ātri, ka tiktu ierobežota to bojāšanās un/vai bakteriālā kontaminācija. Laiks no vistu galvu ņemšanas līdz acu ievietošanai superfūzijas kamerā [*superfusion chamber*] pēc enukleācijas ir iespējami jāsamazina (parasti tam jānotiek divu stundu laikā), lai nodrošinātu testa pieņemamības kritēriju izpildi. Visām testēšanai izmantotajām acīm ir jābūt no vienas noteiktā dienā ņemtu acu grupas.

▼M7

Tā kā acis tiek preparētas laboratorijā, no kautuves apkārtējās vides temperatūrā transportē veselas galvas (parasti no 18 °C līdz 25 °C) plastmasas kārbās, kurās mitrumu uztur ar izotoniskā sāls šķīdumā samitrinātām salvetēm.

***ICE* izmantoto acu izvēles kritēriji un skaits**

Nelieto acis, kurām pēc enukleācijas ir augsts bāzlīnijas fluoresceīna iekrāsošanās rādītājs (t. i., > 0,5) vai radzenes apduļķojuma rādītājs (t. i., > 0,5).

Katrā apstrādes grupā un paralēlajā pozitīvajā kontrolē testē vismaz trīs acis. Negatīvajā kontrolgrupā vai šķīdinātāja kontrolē (ja izmanto šķīdinātāju, kas nav sāls šķīdums) ir jābūt vismaz vienai acij.

Ja cieta ķimikālija tiek atzīta par *GHS* neklasificējamu, ieteicams trīs acis testēt vēlreiz, lai negatīvo rezultātu apstiprinātu vai atmestu.

PROCEDŪRA

Acu sagatavošana

Uzmanīgi noņem plakstiņus, nesabojājot radzeni. Radzenes integritāti ātri novērtē, uz dažām sekundēm tās virsmai uzpilinot 2 % (masas) nātrija fluoresceīnu, ko pēc tam noskalo ar izotonisku sāls šķīdumu. Pēc tam ar fluoresceīnu apstrādātas acis pārbauda ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, ka radzene nav bojāta (t. i., ja fluoresceīna aiztures un radzenes duļķošanās rādītāji ir ≤ 0,5).

Ja acs nav bojāta, to uzmanīgi, nebojājot radzeni, izpreparē no galvaskausa. Acābolu izvelk no dobuma, mirkšķināšanas membrānu stingri pieturot ar ķirurģiskajām knaiblēm, un acs muskuļus pārgriež ar liektām šķērēm ar noapaļotiem galiem. Svarīgi ir nepieļaut radzenes bojājumus pārmērīga spiediena dēļ (t. i., saspiešanas artefaktus).

Aci izņemot no dobuma, pie tās atstāj redzamu daļu redzes nerva. Pēc izņemšanas no dobuma aci novieto uz absorbējoša paliktņa un nogriež mirkšķināšanas membrānu un citus saistaudus.

superfūzijas aparāta kamerā (18). Skavas superfūzijas aparāta kamerā jānovieto tā, lai pilnīgi visa radzene tiktu apstrādāta ar izotonisko sāls šķīdumu (3–4 pilieni minūtē vai 0,1 līdz 0,15 ml/min). Superfūzijas aparāta kameru temperatūrai jābūt 32 ± 1,5 °C. Tipisku mitrināšanas aparāta (ko var iegādāties vai izgatavot) un acu stiprinājuma skavu shēmu sk. 3. papildinājumā. Aparātu var pārveidot atbilstoši konkrētās laboratorijas vajadzībām (piemēram, atšķirīgam acu skaitam).

Pēc ievietošanas superfūzijas aparātā acis vēlreiz apskata ar spraugas lampas mikroskopu, lai pārliecinātos, ka preparēšanas procedūrā tās nav bojātas. Šajā brīdī ar spraugas lampas mikroskopa dziļuma mērīšanas ierīci izmēra radzenes biezumu radzenes virsotnē. Jānomaina acis ar (i) fluoresceīna aiztures rādītāju > 0,5, (ii) radzenes apduļķojumu > 0,5 vai (iii) jebkādām citām bojājumu pazīmēm. No tām acīm, kas netiek izbrāķētas neviena šī kritērija dēļ, izbrāķē tās, kuru radzenes biezums par vairāk nekā 10 % atšķiras no visu acu radzenes vidējā biezuma rādītāja. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu var iegūt atšķirīgus radzenes biezuma mērījumus. Spraugas platums jāiestata 0,095 mm.

▼M7

Kad visas acis ir pārbaudītas un atzītas par derīgām, acis apmēram 45 līdz 60 min inkubē, lai pirms devas ievadīšanas tās līdzsvarotu ar testēšanas sistēmu. Pēc līdzsvarošanas reģistrē radzenes biezuma un apduļķošanās reģistrē nulles punkta mērījumu, ko izmanto par bāzlīniju (t. i., laiks = 0). Šim testēšanas beigupunktam par bāzlīnijas mērījumu izmanto fluoresceīna aiztures rādītāju, kas noteikts acs preparēšanas laikā.

Testējamās ķimikālijas ievadīšana

Tūlīt pēc nulles punkta mērījumiem (turētājā ievietotu) aci izņem no superfūzijas aparāta, novieto horizontāli un uz radzenes aplicē testējamo ķimikāliju.

Testējamās ķimikālijas, kas ir šķidrumi, parasti testē neatšķaidītas, taču tās var atšķaidīt, ja tas tiek uzskatīts par vajadzīgu (piem., tas paredzēts pētījuma plānā). Testējamo ķimikāliju atšķaidīšanai ieteicams izmantot fizioloģisko šķīdumu. Kontrolētos apstākļos var izmantot arī citus šķīdinātājus, taču, izņemot fizioloģisko šķīdumu, citu šķīdinātāju piemērotība ir uzskatāmi jāparāda.

Testējamās ķimikālijas, kas ir šķidrumi, uz radzenes aplicē tā, lai visa radzenes virsma tiktu vienmērīgi noklāta ar testējamo ķimikāliju; standarta tilpums ir 0,03 ml.

Cietas testējamās ķimikālijas iespējami sīki jāsasmalcina piestā vai līdzīgā smalcināšanas ierīcē. Pulveri uz radzenes aplicē tā, lai virsmu vienmērīgi pārklātu ar testējamo ķimikāliju; standarta daudzums ir 0,03 g.

Testējamo ķimikāliju (šķidrumu vai cietvielu) aplicē uz 10 sekundēm un pēc tam noskalo no acs ar izotonisku istabas temperatūras sāls šķīdumu (apmēram 20 ml). Pēc tam aci (ievietotu turētājā) atkal ievieto superfūzijas aparātā sākotnējā vertikālajā stāvoklī. Ja nepieciešams, pēc 10 sekunžu aplicēšanas un laikpunktos pēc tās var veikt papildu skalošanu (piem., atklājot testējamās ķimikālijas atliekas uz radzenes). Parasti papildu skalošanai izmantotā sāls šķīduma daudzumam nav būtiskas nozīmes, svarīgi ir, vai ir novērojama ķimikālijas pielipšana pie radzenes.

Kontroles ķimikālijas

Katrā eksperimentā iekļauj paralēlas negatīvās vai šķīdinātāja/nesēja kontroles un pozitīvās kontroles.

Testējot šķidrumus 100 % koncentrācijā vai cietvielas, *ICE* testēšanas metodē par paralēlu negatīvo kontroli izmanto fizioloģisko šķīdumu, lai konstatētu nerakstu-rīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un pārliecinātos, ka kairinājuma atbildreakcija nerodas testa apstākļu dēļ.

Testējot atšķaidītus šķīdumus, testēšanas metodē iekļauj paralēlu šķīdinātāja/nesēja kontrolgrupu, lai konstatētu nerakstu-rīgas izmaiņas testēšanas sistēmā un pārliecinātos, ka kairinājuma atbildreakcija nerodas testa apstākļu dēļ. Kā noteikts 31. punktā, drīkst izmantot tikai tādu šķīdinātāju/nesēju, par kuru ir pierādīts, ka tam nav nelabvēlīgas ietekmes uz testēšanas sistēmu.

Katrā eksperimentā kā paralēlu pozitīvo kontroli iekļauj zināmu acu kairinātāju, lai pārliecinātos, ka tiek inducēta atbilstoša atbildreakcija. Tā kā šajā testēšanas metodē *ICE* tests tiek izmantots nopietnu acu bojājumu vai nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai, pozitīvajai kontrolei jābūt standartķimikālijai, kas šajā testēšanas metodē izraisa spēcīgu atbildreakciju. Tomēr, lai varētu novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, kairinājuma atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela. Par pozitīvo kontroli jāiegūst pietiekami daudz

▼M7

in vitro datu, lai pozitīvajai kontrolei varētu aprēķināt statistiski noteiktu pieņemamo vērtību intervālu. Ja par konkrētu pozitīvo kontroli nav pieejams pietiekams daudzums vēsturisko *ICE* testēšanas metodes datu, iespējams, jāveic pētījumi, lai šo informāciju iegūtu.

Pozitīvās kontroles piemēri testējamajām ķimikālijām, kas ir šķidrumi, ir 10 % etiķskābe vai 5 % benzalkonija hlorīds, bet cietajām testējamām ķimikālijām — nātrija hidroksīds vai imidazols.

Etalonķimikālijas palīdz novērtēt nezināmas konkrētas ķimikāliju vai produktu kategorijas ķimikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai novērtēt acu kairinātāja salīdzinošo spēju izraisīt noteiktas intensitātes kairinājuma atbildreakciju.

Mērāmie beigupunkti

Apstrādātās radzenes novērtē pirms aplicēšanas un 30, 75, 120, 180 un 240 min (± 5 min) pēc skalošanas, kas veikta pēc apstrādes. Ar šiem laikpunktiem pietiek, lai četru stundu ilgajā apstrādes periodā veiktu pietiekamu skaitu mērījumu un starp mērījumiem būtu pietiekami ilgs laiks vajadzīgo novērojumu veikšanai visām acīm.

Novērtē šādus parametrus: radzenes apduļķojums, pietūkums, fluoresceīna aizture un morfoloģiskās izmaiņas (piem., epitēlija bedrainums vai atslābšana). Katrā no iepriekš minētajiem laikpunktiem nosaka visus beigupunktus, izņemot fluoresceīna aizturi (ko nosaka tikai pirms aplicēšanas un 30 min pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai).

Radzenes apduļķojumu, fluoresceīna aizturi, morfoloģiskās izmaiņas un histopatoloģiskos novērojumus, ja tādi tiek izdarīti, ieteicams dokumentēt fotogrāfijās.

Pēc pēdējās apskates četru stundu perioda beigās ieteicams acis saglabāt piemērotā fiksatīvā (piem., neitrālā buferētā formalīnā) iespējamai histopatoloģiskai izmeklēšanai (sīkāku informāciju sk. 14. punktā un (8)).

Radzenes pietūkumu nosaka no radzenes biezuma mērījumiem ar spraugas lampas mikroskopa optisko pahimetru. To izsaka procentos un aprēķina pēc radzenes biezuma mērījumiem saskaņā ar šādu formulu:

$$\left(\frac{corneal\ thickness\ at\ time\ t - corneal\ thickness\ at\ time = 0}{corneal\ thickness\ at\ time = 0} \right) \times 100$$

Visiem novērojumu laikpunktiem aprēķina visu testa acu radzeņu vidējo pietūkumu procentos. Pamatojoties uz jebkurā laikpunktā novēroto augstāko vidējo radzenes pietūkuma rādītāju, katrai testējamajai ķimikālijai piešķir kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

Radzenes apduļķojumu izvērtē, novērtējot to radzenes daļu, kas ir visapduļķotākā, kā redzams 1. tabulā. Aprēķina visu testa acu vidējo radzenes apduļķojumu visos novērojumu laikpunktos. Pamatojoties uz jebkurā laikpunktā novēroto augstāko vidējo radzenes apduļķojuma rādītāju, katrai testējamajai ķimikālijai piešķir kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

▼M7

1. tabula

Radzenes apduļķojuma rādītājs

Vērtējums	Piezīmes
0	Apduļķojuma nav
0,5	Ļoti vājš apduļķojums
1	Izkaisītas vai difūzas zonas, labi redzamas varavīksnenes daļas
2	Labi izšķirama caurspīdīgā daļa, varavīksnenes daļas redzamas nedaudz neskaidri
3	Izteikts radzenes apduļķojums, varavīksnenes daļas nav redzamas, acs zīlītes izmērs tikko saskatāms
4	Pilnīgs radzenes apduļķojums, varavīksnene nav saskatāma

Fluoresceīna aizturi izvērtē tikai 30 min novērošanas laikpunktā, kā redzams 2. tabulā. Pēc tam aprēķina visu testa acu vidējo fluoresceīna aiztures vērtību 30 min novērošanas laikpunktā un to izmanto, lai katrai testējamai ķimikālijai piešķirtu kopējo kategorijas vērtējumu (sk. 51. punktu).

2. tabula.

Fluoresceīna aiztures rādītājs

Vērtējums	Novērojums
0	Fluoresceīna aiztures nav
0,5	Ļoti neliela atsevišķu šūnu iekrāsošanās
1	Neregulāra atsevišķu šūnu iekrāsošanās visā apstrādātajā radzenes daļā
2	Koncentrēta vai konfluenta blīva atsevišķu šūnu iekrāsošanās
3	Lielas, konfluentas radzenes daļas iekrāsošanās ar fluoresceīnu

Morfoloģisko izmaiņu veidi ir radzenes epitēlija šūnu "bedrošanās" [*pitting*], epitēlija "atslābšana" [*loosening*], radzenes virsmas "sarepēšana" [*roughening*] un testējamās ķimikālijas "pielipšana" [*sticking*] pie radzenes. Šo bojājumu smaguma pakāpe var atšķirties, un vairākas šīs pazīmes var konstatēt vienlaicīgi. Atkarībā no testēšanas veicēja interpretācijas šo bojājumu klasifikācija ir subjektīva.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

Radzenes apduļķošanās, pietūkuma un fluoresceīna aiztures rezultāti jānovērtē atsevišķi, lai katram beigupunktam iegūtu *ICE* klasi. Pēc tam attiecīgās testējamās ķimikālijas izraisītā kairinājuma klasifikācijas noskaidrošanai visiem beigupunktiem noteiktās *ICE* klases apvieno.

Lēmuma pieņemšanas kritēriji

Pēc visu beigupunktu novērtēšanas var piešķirt *ICE* klases, pamatojoties uz iepriekš noteiktiem rādītāju vērtību intervāliem. Radzenes pietūkumu (3. tabula), apduļķošanos (4. tabula) un fluoresceīna aizturi (5. tabula) atbilstoši četrām *ICE* klasēm interpretē šādi: Ir svarīgi piebilst, ka 3. tabulā norādītos radzenes pietūkuma rādītājus izmanto tikai tad, ja biezums ir mērīts ar spraugas lampas mikroskopu (piem.,

▼M7

ar *Haag-Streit* BP900), izmantojot dziļuma mērīšanas ierīci Nr. 1 un spraugas platuma iestatījuma vērtību $9\frac{1}{2}$, kas ir 0,095 mm. Lietotājiem jāņem vērā, ka, izmantojot spraugas lampas mikroskopu, ar dažādu spraugas platumu var iegūt atšķirīgus radzenes biezuma mērījumus.

3. tabula

***ICE* radzenes pietūkuma klasifikācijas kritēriji**

Vidējais radzenes pietūkums (%) (*)	*ICE* klase
no 0 līdz 5	I
> 5 līdz 12	II
> 12 līdz 18 (> 75 min pēc apstrādes)	II
> 12 līdz 18 (≤ 75 min pēc apstrādes)	III
> 18 līdz 26	III
> 26 līdz 32 (> 75 min pēc apstrādes)	III
> 26 līdz 32 (≤ 75 min pēc apstrādes)	IV
> 32	IV

(*) Augstākais novērotais vidējais rādītājs jebkurā laikpunktā.

4. tabula

***ICE* klasifikācijas kritēriji duļķošanās novērtēšanai**

Maksimālais vidējais apduļķošanās rādītājs (*)	*ICE* klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Augstākais novērotais vidējais rādītājs jebkurā laikpunktā (atbilstoši 1. tabulā noteiktajiem duļķošanās vērtējumiem).

5. tabula

***ICE* klasifikācijas kritēriji fluoresceīna aiztures vidējā rādītāja novērtēšanai**

Fluoresceīna aiztures vidējais rādītājs 30 min pēc apstrādes (*)	*ICE* klase
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Atbilstoši 2. tabulā noteiktajiem vērtējumiem.

Testējamās ķimikālijas *in vitro* klasifikāciju nosaka pēc *GHS* klasifikācijas, kas atbilst radzenes pietūkuma, radzenes apduļķošanās un fluoresceīna aiztures rādītāju kategoriju kombinācijai, kā aprakstīts 6. tabulā.

▼M7

6. tabula

Kopējās *in vitro* klasifikācijas

ANO *GHS* klasifikācija	3 beigupunktu kombinācijas
Nekategorizēta	3 x I 2 x I, 1 x II
Nav iespējams prognozēt	Citas kombinācijas
1. kategorija	3 x IV 2 x IV, 1 x III 2 x IV, 1 x II (*) 2 x IV, 1 x I (*) Radzenes apduļķošanās 30 min laikpunktā ≥ 3 (vismaz 2 acīm) Radzenes apduļķošanās kādā laikpunktā = 4 (vismaz 2 acīm) Ievērojama epitēlija atslābšana (vismaz 1 acij)

(*) Mazāk varbūtīgas kombinācijas.

Pētījuma pieņemamības kritēriji

Testu uzskata par pieņemamu, ja paralēlās negatīvās vai nesēja/šķīdinātāja kontroles un paralēlās pozitīvās kontroles tiek attiecīgi identificētas kā *GHS* neklasificējamas un *GHS* 1. kategorijas ķimikālijas.

Testēšanas pārskats

Ja tā attiecas uz pētījuma norisi, testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamās un kontroles ķimikālijas

— ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service* (*CAS*) izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;

— *CAS* reģistra numurs, ja tas ir zināms;

— testējamās/kontroles ķimikālijas tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;

— fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz pētījuma norisi, piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, ķīmiskā klase, šķīdība ūdenī;

— testējamo/kontroles ķimikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana);

— stabilitāte, ja zināma.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

— sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese;

— norāde par acu ņemšanas vietu (t. i., iestāde, kur tās ņemtas).

Testēšanas metodes apstākļi

— izmantotās testa sistēmas apraksts;

▼M7

— izmantotais sprauga lampas mikroskops (piem., modelis) un izmantotā spraugas lampas mikroskopa instrumentu iestatījumi;

— norāde uz vēsturisko negatīvo un pozitīvo kontroļu rezultātiem un vēsturiskie dati, kas apliecina pieņemamus paralēlo etalonkontroļu diapazonus, ja tādi ir pieejami;

— procedūra, ko izmanto, lai nodrošinātu testēšanas metodes integritāti (t. i., pareizību un ticamību) laikā (piem., periodiska standartķimikāliju testēšana).

Acu ņemšana un sagatavošana

— donordzīvnieka vecums un svars un citas specifiskas to dzīvnieku raksturīpašības, no kuriem acis ņemtas (piem., dzimums, celms);

— acu glabāšanas un transportēšanas apstākļi (piem., acu ņemšanas datums un laiks, laiks no vistu galvu ņemšanas līdz enukleēto acu ievietošanai superfūzijas kamerā);

— acu sagatavošana un novietošana, ieskaitot ziņas par to kvalitāti, acu kameru temperatūru un testēšanai izmantoto acu atlases kritērijiem.

Testa procedūra

— izmantoto replikātu skaits;

— izmantoto negatīvo un pozitīvo kontroļu (attiecīgā gadījumā arī šķīdinātāja kontroļu un etalonkontroļu) identitāte;

— testējamās ķimikālijas deva, aplicēšana un ekspozīcijas laiks;

— novērošanas laikpunkti (pirms un pēc apstrādes);

— izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts;

— izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts;

— testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Rezultāti

— tabula ar radzenes pietūkuma, apduļķojuma un fluoresceīna aiztures rādītājiem par katru aci atsevišķi un katrā novērojumu laikpunktā, tostarp katras testa acs vidējie rādītāji katrā novērojumu laikā;

— augstākie novērotie vidējie radzenes pietūkuma, apduļķojuma un fluoresceīna aiztures rādītāji (no jebkura laikpunkta) un to attiecīgā *ICE* klase;

— jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts;

— iegūtā *in vitro GHS* klasifikācija;

— attiecīgos gadījumos acs fotogrāfijas.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

▼**M7**

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Pieejams: [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. Pieejams: [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) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Pieejams: [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. Pieejams: [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) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(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. Pieejams: [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. Pieejams: [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. Pieejams: [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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs(-i) un uzticams(-i) ieguves avots(-i); (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo ķimikāliju klasi, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem ietekmes veidiem un (v) zināma potence vēlamās atbildreakcijas diapazonā.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietna acu bojājuma izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (pozitīvs rezultāts).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

Radzenes apduļķojums: izmērītā radzenes apduļķošanās pakāpe pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes apduļķojuma palielināšanās liecina par radzenes bojājumiem.

Radzenes pietūkums: objektīvs *ICE* testa mērījums, kas norāda, kādā mērā radzene pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai ir pietūkusi. To izsaka procentos un aprēķina pēc radzenes bāzlīnijas (pirms devas ievadīšanas) biezuma mērījumiem un biezuma, kas *ICE* testā regulāros intervālos reģistrēts pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Radzenes pietūkuma pakāpe ir radzenes bojājumu indikators.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acābola priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un "ANO *GHS* 2. kategorijav" (4).

Pseidonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas rādītājiem.

Pseidopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas rādītājiem.

Fluoresceīna aizture: subjektīvs *ICE* testa rādītājs, kas norāda, kādā mērā radzenes epitēlija šūnas pēc ekspozīcijas testējamajai vielai aiztur nātrija fluoresceīnu. Fluoresceīna aiztures pakāpe ir radzenes epitēlija bojājumu indikators.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Nopietni acu bojājumi" un "ANO *GHS* 1. kategorija".

▼M7

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (4).

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Neklasificētas ķimikālijas: vielas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājumu (ANO *GHS* 2. kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO *GHS* 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko "ANO *GHS* nekategorizētas ķimikālijas".

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, spēcīgās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību tajā pašā laboratorijā un dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Acu kairinājums" un "ANO *GHS* 2. kategorija".

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājums vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un "ANO *GHS* 1. kategorija" (4).

Spraugas lampas mikroskops: instruments, ko izmanto acs tiešai apskatīšanai binokulārā mikroskopa palielinājumā un kas rada stereoskopisku, vertikālu attēlu. *ICE* testēšanas metodē šo instrumentu izmanto, lai apskatītu vistas acs priekšējās struktūras, kā arī objektīvi izmērītu radzenes biezumu ar dziļuma mērīšanai paredzētu palīgierīci.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Viela: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (4).

Virsmaktīva viela: saukta arī par virsmaktīvu aģentu, ir viela, piem., detergents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju.

▼M7

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO *GHS*): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (4).

ANO *GHS* 1. kategorija: sk. "Nopietni acu bojājumi" un/vai "Neatgriezeniska ietekme uz acīm".

ANO *GHS* 2. kategorija: sk. "Acu kairinājums" un/vai "Atgriezeniska ietekme uz acīm".

ANO *GHS* nekategorizēta ķimikālija: vielas, kuras neatbilst kritērijiem klasificēšanai ANO *GHS* 1. vai 2. (2.A vai 2.B) kategorijā. Nozīmē to pašu, ko "neklasificētas ķimikālijas".

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķimikālijas bīstamības potenciālu.

▼M7

2. papildinājums

ICE TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶIMIKĀLIJAS

Pirms šai testēšanas metodei atbilstīgas testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijas uzskatāmi apliecina savu tehnisko kompetenci, pareizi nosakot klasifikāciju 1. tabulā ieteiktajām 13 vielām, kas izraisa acu apdraudējumus. Šīs ķimikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu acu apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (*TG* 405) un ANO *GHS* klasifikācijas sistēmu (t. i., ANO *GHS* 1., 2.A, 2.B kategorija vai nekategorizētas ķimikālijas) (4) (6). Citi atlases kritēriji bija ķimikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsauces datu pieejamība un kvalitatīvu ar *ICE* testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Atsauces dati ir pieejami *SSD* (5) un *ICCVAM* papildinformācijas pārskata dokumentos par *ICE* testēšanas metodi (9).

1. tabula

Ķimikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot *ICE* testēšanas metodi

Ķimikālija	*CAS* Nr.	Ķīmiskā klase (1)	Agregātstāvoklis	*In vivo* klasifikācija (2)	*In vitro* klasifikācija (3)
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidrs	1. kategorija	1. kategorija
Hlorheksidīns	55-56-1	Amīns, amidīns	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Dibenzoil-L-vīnskābe	2743-38-6	Karbonskābe, esteris	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Imidazols	288-32-4	Heterociklisks	Ciets	1. kategorija	1. kategorija
Trihloretiķskābe (30 %)	76-03-9	Karbonskābe	Šķidrs	1. kategorija	1. kategorija
2,6-Dihlorbenzoilhlorīds	4659-45-4	Acilhalogenīds	Šķidrs	2.A kategorija	Nav iespējams prognozēt (4)
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganisks sāls	Ciets	2.A kategorija (5)	Nav iespējams prognozēt (4)
Etil-2-metilacetoacetāts	609-14-3	Ketons, esteris	Šķidrs	2.B kategorija	Nav iespējams prognozēt (4)
Dimetilsulfoksīds	67-68-5	Organisks sēra savienojums	Šķidrs	Nekategorizēta	Nekategorizēta
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidrs	Nekategorizēta	Nekategorizēta (robežgadījums)
Metilciklopentāns	96-37-7	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Šķidrs	Nekategorizēta	Nekategorizēta
n-heksāns	110-54-3	Ogļūdeņradis (aciklisks)	Šķidrs	Nekategorizēta	Nekategorizēta

▼**M7**

Ķimikālija	*CAS* Nr.	Ķīmiskā klase ([1])	Agregātst-āvoklis	*In vivo* klasifikācija ([2])	*In vitro* klasifikācija ([3])
Triacetīns	102-76-1	Lipīds	Šķidrs	Neklasificēta	Nekategorizēta

Saīsinājumi: *CAS* Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

([1]) Ķimikāliju klases katrai testējamai ķimikālijai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (*MeSH*) klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Pamatojoties uztruša acu *in vivo* testa rezultātiem (ESAO *TG* 405) un izmantojot ANO *GHS* sistēmu (4)(6).

([3]) Pamatojoties uz 6. tabulā norādītajiem *ICE* rezultātiem.

([4]) Apvienoti *ICE* rādītāji, izņemot tos, kas norādīti 6. tabulā *GHS* neklasificējamo ķimikāliju kategorijas un *GHS* 1. kategorijas identificēšanai (sk. 6. tabulu).

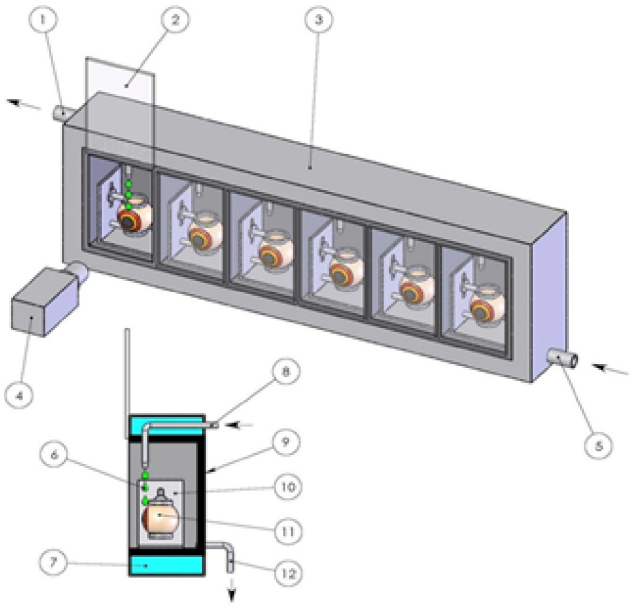
([5]) Klasificēšana 2.A vai 2.B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO *GHS* kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2.A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai ātrāk saruka līdz nullei. Vienam dzīvniekam, kurš pilnīgi neatlaba līdz 7. dienai, konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1 (7. dienā), bet 10. dienā tas pilnīgi izzuda.

▼M7

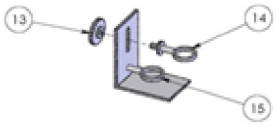
3. papildinājums

ICE SUPERFŪZIJAS APARĀTA UN ACU SKAVU SHĒMAS

(Papildu vispārējus aprakstus par superfūzijas aparātu un acu skavu sk. Burton et al. (18))



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Detaļas Nr.	Apraksts	Detaļas Nr.	Apraksts
1	Siltā ūdens izvadkanāls	9	Nodalījums
2	Bīdāmas durvis	10	Acs turētājs
3	Superfūzijas aparāts	11	Vistas acs
4	Optiskais mērinstruments	12	Sāls šķīduma izvadkanāls
5	Siltā ūdens ievadkanāls	13	Iestatīšanas skrūve
6	Sāls šķīdums	14	Regulējams augšējais turētājs
7	Silts ūdens	15	Fiksēts apakšējais turētājs;
8	Sāls šķīduma ievadkanāls		

▼M7

B.49. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU MIKROKODOLU *IN VITRO* TESTS

IEVADS

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijai Nr. 487 (2016). Tā ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

In vitro mikrokodolu *(MNvit*) tests ir genotoksicitātes tests mikrokodolu (*MN*) detektēšanai interfāzes šūnu citoplazmā. Mikrokodoli var būt no acentriskiem hromosomu fragmentiem (t. i., tādiem, kuriem nav centromēra) vai no veselām hromosomām, kuras šūnu dalīšanās anafāzē nespēj atvirzīties uz šūnas poliem. Tādējādi *MNvit* tests ir *in vitro* metode, kas dod visaptverošu pamatu hromosomu bojājumu potenciāla izpētei *in vitro*, jo ļauj detektēt gan aneigēnus, gan klastogēnus (2) (3) šūnās, kurās laikā, kad tās eksponētas testējamajai ķimikālijai, vai pēc tam ir notikusi šūnu dalīšanās (sīkāku informāciju sk. 13. punktā). Mikrokodoli reprezentē meitšūnām nodotos bojājumus, bet metafāzes šūnās uzskaitītās hromosomu aberācijas tālāk nodotas nereti netiek. Jebkurā gadījumā pārmaiņas var nebūt saderīgas ar šūnu izdzīvošanu.

Šī testēšanas metode ļauj izmantot testēšanas protokolu ar aktīna polimerizācijas inhibitoru citohalazīnu B (*cytoB*) vai bez tā. *CytoB* pievienošana pirms mitozes rada divkodolu šūnas un līdz ar to ļauj identificēt un analizēt mikrokodolus tikai tajās šūnās, kurās ir noslēgusies viena mitoze (4) (5). Turklāt, ja ir pierādījumi tam, ka analizējamā šūnu populācijā ir notikusi mitoze, šī testēšanas metode ļauj izmantot testēšanas protokolus, kuri neparedz citokinēzes bloķēšanu.

Papildus *MNvit* testa izmantojumam mikrokodolus inducējošu ķimikāliju identificēšanai papildu informāciju par hromosomu bojājumu mehānismiem un mikrokodolu veidošanos var iegūt ar citiem noderīgiem paņēmieniem, piem., kinetohoru imūnķīmisko iezīmēšanu vai hibridizēšanu ar centromēru/telomēru zondēm (fluorescenta *in situ* hibridizēšana, *FISH*) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Tādas iezīmēšanas un hibridizēšanas procedūras var izmantot, ja konstatēta pastiprināta mikrokodolu veidošanās un pētnieks vēlas noskaidrot, vai šā pastiprinājuma izraisītāja iedaba ir klastogēniska un/vai aneigēniska.

Tā kā mikrokodolus interfāzes šūnās var novērtēt salīdzinoši objektīvi, laboratorijas personāla vienīgais uzdevums ir noteikt, kāds ir divkodolu šūnu skaitu, kad ir izmantots *cytoB*, un (visos gadījumos) mikrokodolu incidenci. Tā priekšmetstikliņus novērtēt var relatīvi ātri un analīzi var automatizēt. Tāpēc ir praktiski iespējams vienā apstrādes reizē novērtēt tūkstošiem, nevis simtiem šūnu un tādā veidā palielināt testa jaudu. Visbeidzot, tā kā mikrokodoli var izveidoties no hromosomām, kas ir aizkavējušās hromosomas, ar šo metodi potenciāli var detektēt aneiploīdiju inducējošus aģentus, kurus ir sarežģīti pētīt ar parastajiem hromosomu aberācijas testiem, piem., šā pielikuma B.10. nodaļas testu (18). Tomēr šajā testēšanas metodē aprakstītais *MNvit* tests bez īpašiem paņēmieniem, piem., 4. punktā minētās *FISH*, neļauj tās ķimikālijas, kuras inducē hromosomu skaita izmaiņas un/vai ploīdiju, diferencēt no tām, kuras inducē klastogenitāti.

MNvit tests ir robusts, un to var veikt ar dažādu tipu šūnām, ar *cytoB* vai bez tā. Bagātīgs datu klāsts apstiprina *MNvit* testa derīgumu dažādu veidu šūnām (šūnu līniju kultūrām vai primāro šūnu kultūrām) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Īpaši jāatzīmē starptautiskie validācijas pētījumi, kuru norisi koordinējusi Francijas Genotoksikoloģijas biedrība [*Société Française de Toxicologie Génétique*] (*SFTG*) (19) (20) (21) (22)

▼M7

(23), un Starptautiskā Genotoksikoloģijas darbsemināra ziņojumi (5) (17). Veicot apliecinājuma nozīmes retrospektīvu validācijas pētījumu, pieejamos datus turklāt atkārtoti izvērtējis Eiropas Komisijas (EK) izveidotais Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (*ECVAM*), un *ECVAM* zinātniskā padome (*ESAC*) šo testēšanas metodi ir atzinusi par zinātniski derīgu (37) (38) (39).

Zīdītāju šūnu *MNvit* testam var izmantot cilvēka vai grauzēja izcelsmes šūnu līniju kultūras vai primāro šūnu kultūras. Testa jutīgumu ietekmē mikrokodolu fona biežums, tāpēc ieteicams izmantot šūnu tipus ar stabiliem un noteiktiem mikrokodolu veidošanās biežuma fona rādītājiem. Izmantojamās šūnas izvēlas pēc to spējas labi augt kultūrā, kariotipa stabilitātes (tostarp hromosomu skaita) un mikrokodolu spontānā biežuma (40). Šobrīd pieejamie dati neļauj sniegt stingrus ieteikumus, taču vedina domāt, ka ķīmiskā apdraudējuma izvērtēšanā ir svarīgi ņemt vērā *p53* statusu, ģenētisko (kariotipa) stabilitāti, DNS reparācijas spēju un testēšanai izvēlēto šūnu izcelsmi (grauzēja vai cilvēka). Līdz ar to šīs testēšanas metodes lietotāji tiek mudināti ņemt vērā, kā šīs un citas šūnu īpatnības ietekmē šūnu līnijas veiktspēju mikrokodolu indukcijas detektēšanā, ņemot vērā zināšanu attīstību šajā jomā.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Ja vien šūnas attiecībā uz testējamām ķimikālijām nav metaboliski kompetentas, *in vitro* testos parasti jāizmanto eksogēns metaboliskās aktivācijas avots. Eksogēnā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi. Jāievēro piesardzība, lai izvairītos no apstākļiem, kas varētu radīt artefaktiski pozitīvus rezultātus, kuri neatspoguļo testējamo ķimikāliju genotoksicitāti. Tādi apstākļi ietver pH vai osmolalitātes izmaiņas (41) (42) (43), mijiedarbību ar šūnu barotni (44) (45) vai pārmērīgus citotoksicitātes līmeņus (sk. 29. punktu).

Lai varētu analizēt mikrokodolu inducēšanos, ir izšķirīgi svarīgi, lai apstrādātajās un neapstrādātajās kultūrās būtu notikusi mitoze. Visnoderīgāk mikrokodolus uzskaitīt ir tad, kad šūnās laikā, kad tās apstrādā ar testējamo ķimikāliju, vai pēc tam ir noslēdzies viens mitozes cikls. Attiecībā uz ražotiem nanomateriāliem šo testēšanas metodi var būt nepieciešams īpaši pielāgot, bet šajā testēšanas metodē tas nav aprakstīts.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

TESTA PRINCIPS

Uz cilvēka vai citu zīdītāju izcelsmes šūnu kultūrām iedarbojas ar testējamo ķimikāliju, izmantojot eksogēnu metaboliskās aktivācijas avotu un arī bez tā, ja vien nelieto šūnas ar adekvātu metabolisko kapacitāti (sk. 19. punktu).

Laikā, kad šūnas tiek eksponētas testējamajai ķimikālijai vai pēc tam šūnas audzē pietiekami ilgi, lai hromosomu bojājumi vai cita ietekme uz šūnu ciklu / šūnu dalīšanos varētu izpausties kā mikrokodolu rašanās interfāzes šūnās. Lai inducētos aneiploīdija, parasti mitozei jānotiek testējamās ķimikālijas klātbūtnē. Savāktās un iekrāsotās interfāzes šūnas analizē uz mikrokodolu klātbūtni. Ideālā gadījumā mikrokodoli jāuzskaita tikai tajās šūnās, kurās mitoze noslēgusies laikā,

▼M7

kad šūnas eksponētas testējamajai ķimikālijai, vai pēcapstrādes periodā, ja tāds ir. Ar citokinēzes bloķētāju apstrādātās kultūrās to ir vienkārši panākt, uzskaitot tikai divkodolu šūnas. Ja nav pieejams citokinēzes bloķētājs, ir svarīgi pierādīt, ka analizētajās šūnās, visticamāk, ir notikusi šūnu dalīšanās, pamatojoties uz šūnu populācijas pieaugumu laikā, kad tās eksponētas testējamajai ķimikālijai vai pēc tam. Visu protokolu gadījumā ir svarīgi pierādīt, ka šūnu savairošanās ir notikusi gan kontroles, gan apstrādātajā kultūrā; visās kultūrās, kurās uzskaita mikrokodolus, jānovērtē testējamās ķimikālijas inducētās citotoksicitātes vai citostāzes pakāpe.

METODES APRAKSTS

Šūnas

Iespējams izmantot kultivētus primāros cilvēku vai citu zīdītāju perifērisko asiņu limfocītus (7) (20) (46) (47) un vairākas grauzēju šūnu līnijas, piemēram, *CHO*, V79, *CHL/IU* un L5178Y šūnas vai cilvēka šūnu līnijas, piemēram, TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (sk. 6. punktu). Mikrokodolu testēšanā ir izmantotas arī citas šūnu līnijas, piem., HT29 (48), *Caco-2* (49), *HepaRG* (50) (51), *HepG2* šūnas (52) (53), A549 un Sīrijas kāmja embrija primārās šūnas (54), taču tās vēl nav plaši validētas. Tādēļ, ja izmanto kādu no šīm šūnu līnijām un tipiem, tas jāpamato ar uzskatāmi parādītu veiktspēju testā, kā aprakstīts sadaļā par pieņemamības kritērijiem. Ir ziņots, ka *cytoB* potenciāli ietekmē L5178Y šūnu augšanu, tādēļ to izmantot ar šo šūnu līniju nav ieteicams (23). Ja izmanto primārās šūnas, dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ jāapsver cilvēka izcelsmes šūnu izmantošana, ja tā iespējama, un tās jāparaugo saskaņā ar attiecīgajiem ētikas principiem un noteikumiem.

Cilvēka perifērisko asiņu limfocīti jāiegūst no jauniem (aptuveni 18–35 gadus veciem) nesmēķētājiem, kuriem nav zināmu slimību vai kuri pēdējā laikā nav tikuši eksponēti genotoksiskiem faktoriem (piem., ķimikālijām, jonizējošajam starojumam) tādā apmērā, kas palielinātu mikrokodolus saturošu šūnu fona incidenci. Tas nodrošinātu, ka mikrokodolus saturošu šūnu fona incidence ir zema un nemainīga. Palielinoties vecumam, mikrokodolus saturošu šūnu bāzlīnijas līmenis palielinās, un sievietēm šī tendence novērojama izteiktāk nekā vīriešiem (55). Ja izmanto šūnas no vairāk nekā viena donora, jānorāda donoru skaits. Jāpierāda, ka šūnas no laika, kad sākta apstrāde ar testējamo ķimikāliju, līdz šūnu paraugošanai ir dalījušās. Šūnu kultūras uztur šūnu eksponenciālas augšanas fāzē (šūnu līnijas) vai stimulē dalīties (limfocītu primārās kultūras), lai šūnas eksponētu dažādos šūnas cikla posmos, jo konkrētu šūnas attīstības posmu jutība pret testējamo ķimikāliju var nebūt zināma. Primārās šūnas, kuras dalīšanas nolūkos jāstimulē ar mitogēnām vielām, parasti vairs nesinhronizē, kamēr tās eksponē testējamai ķimikālijai (piem., cilvēka limfocīti pēc 48 stundu mitogēnās stimulācijas). Kamēr norit apstrāde ar testējamo ķimikāliju, izmantot sinhronizētas šūnas nav ieteicams, taču tas var būt pieņemami, ja tiek pamatots.

Barotne un kultivēšanas apstākļi

Kultūru uzturēšanai lieto piemērotas barotnes un ievēro atbilstošus kultivēšanas apstākļus (kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar 5 % CO_2 koncentrāciju, ja nepieciešams, 37 °C temperatūra). Šūnu līnijām regulāri jāpārbauda modālā hromosomu skaita stabilitāte un jāpārliecinās, ka nav notikusi kontaminācija ar mikoplazmu, un šūnas nedrīkst izmantot, ja konstatē kontamināciju vai ja modālais hromosomu skaits ir mainījies. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu līniju vai primāro kultūru normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem.

▼M7

Kultūru sagatavošana

Šūnu līnijas: šūnas pavairo no pamatkultūrām, ko barotnē uzsēj tādā blīvumā, lai kultūras suspensijās vai monoslānī eksponenciāli augtu līdz šūnu savākšanai (piem., jāizvairās no monoslānī augošu šūnu konfluences).

Limfocīti: nesadalītas asinis, kas apstrādātas ar antikoagulantu (piem., heparīnu), vai tikai limfocītus kultivē (piem., 48 stundas cilvēka limfocītu gadījumā) mitogēna klātbūtnē (piem., cilvēka limfocītu gadījumā — fitohemaglutinīna (*PHA*) klātbūtnē), lai pirms šūnu eksponēšanas testējamai ķimikālijai un *cytoB* inducētu to dalīšanos.

Metaboliskā aktivācija

Ja izmanto šūnas ar nepietiekamu endogēno metabolisko kapacitāti, jālieto eksogēnas metabolizācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piem., *Aroclor 1254* (56) (57) vai fenobarbitālu kombinācijā ar b-naftoflavonu (58) (59) (60). Pēdējā minētā kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (30) un jauktas funkcijas oksidāžu inducēšanā izrādījusies tikpat efektīva kā *Aroclor 1254* (24) (25) (26) (28). S9 frakciju parasti izmanto koncentrācijā 1–2 % (tilp./tilp.), bet galīgajā testa barotnē to var palielināt līdz 10 % (tilp./tilp.). Apstrādes laikā jāizvairās no tādu produktu izmantošanas, kas samazina mitotisko indeksu, jo īpaši kalcija kompleksveidošanas produktiem (62). Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķimikāliju klase.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo atbilstošos šķīdinātājos un, ja vajadzīgs, pirms šūnu apstrādes jāatšķaida. Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas jātestē ar attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piem., apstrādi veicot hermētiski noslēgtos traukos (63) (64) (65). Testējamās ķimikālijas preparāti jāsagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātāji

Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķimikālijas šķīdību, šķīdinātājam neatstājot negatīvu ietekmi uz testa norisi — nemainot šūnu augšanu, neietekmējot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metabolisko aktivāciju utt. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantot šķīdinātāju (vai barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji ir ūdens vai dimetilsulfoksīds (DMSO). Parasti organiskajiem šķīdinātājiem nevajadzētu pārsniegt 1 % (tilp./tilp.). Ja *cytoB* izšķīdina DMSO, testējamai ķimikālijai un *cytoB* izmantotais kopējais organiskā šķīdinātāja daudzums

▼M7

nedrīkst pārsniegt 1 % (tilp./tilp.); pretējā gadījumā jāizmanto neapstrādātas kontroles, lai nodrošinātu, ka organiskā šķīdinātāja īpatsvaram nav negatīvas ietekmes. Šķīdinātājiem uz ūdens (vai sālsūdens) bāzes nevajadzētu pārsniegt 10 % (tilp./tilp.) galīgajā apstrādes barotnē. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamo ķimikāliju, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja to apliecinošu datu nav, ir svarīgi izmantot neapstrādātas kontroles (sk. 1. papildinājumu), kā arī šķīdinātāja kontroles, lai parādītu, ka izvēlētais šķīdinātājs nerada nekādu kaitīgu ietekmi un neietekmē hromosomas (piem., izraisot aneiploīdiju vai klastogenitāti).

CytoB kā citokinēzes bloķētāja lietošana

Viens no svarīgākajiem apsvērumiem *MNvit* testa veiktspējas aspektā ir tas, lai vērtēto šūnu mitoze būtu pilnīgi noritējusi apstrādes laikā vai pēcapstrādes inkubēšanas laikā, ja tāds ir. Mikrokodolu uzskaite tāpēc jāveic tikai tajās šūnās, kurās mitoze ir noritējusi apstrādes laikā vai pēc tās. *CytoB* ir aģents, kas par citokinēzes bloķētāju izmantots visplašāk, jo tas inhibē aktīna veidošanos un tādējādi neļauj meitšūnām pēc mitozes atdalīties; tā rodas divkodolu šūnas (6) (66) (67). Izmantojot *cytoB*, vienlaikus var mērīt testējamās ķimikālijas ietekmi uz šūnu savairošanās kinētiku. *CytoB* ieteicams izmantot par citokinēzes bloķētāju, ja izmanto cilvēka limfocītus, jo šūnu cikla ilgumi dažādiem donoriem atšķiras un ne visi limfocīti reaģē uz stimulāciju ar *PHA*. *CytoB* nav obligāti izmantot citu veidu šūnām, ja ir iespējams noteikt, ka ir notikusi to dalīšanās, kā aprakstīts 27. punktā. Turklāt *cytoB* parasti neizmanto, kad paraugi attiecībā uz mikrokodolu klātbūtni tiek izvērtēti, izmantojot plūsmas citometriju.

Laboratorijā katram šūnu veidam jānosaka atbilstošā *cytoB* koncentrācija, lai šķīdinātāja kontrolkultūrās panāktu divkodolu šūnu optimālo biežumu, un jāpārāda, ka tā nodrošina labu divkodolu šūnu daudzumu vērtēšanai. Piemērotas *cytoB* koncentrācijas parasti ir starp 3 un 6 μg/ml (19).

Šūnu savairošanās un citotoksicitātes mērīšana un apstrādes koncentrācijas izvēle

Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizvēlas koncentrācijas, kas spēj radīt artefaktiski pozitīvas atbildreakcijas, piemēram, tādas koncentrācijas, kas izraisa pārmērīgu citotoksicitāti (sk. 29. punktu), nogulsnes barotnē (sk. 30. punktu) vai manāmi izmaina pH vai osmolalitāti (sk. 9. punktu). Ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi izmaina barotnes pH, pH var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu, lai izvairītos no artefaktiski pozitīviem rezultātiem un saglabātu pienācīgus kultivēšanas apstākļus.

Mēra šūnu savairošanos, lai nodrošinātu, ka pietiekami daudzās apstrādātajās šūnās testēšanas laikā ir beigusies mitoze un ka apstrāde tiek veikta attiecīgā citotoksicitātes līmenī (sk. 29. punktu). Citotoksicitāti nosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisma aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu nāves un augšanas rādītājus (sk. 26. un 27. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā iepriekš veiktā testā var būt lietderīga, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Ja to veic, tas nedrīkst aizstāt citotoksicitātes mērījumu galvenajā eksperimentā.

Kultūru apstrāde ar *cytoB* un vienkodola, divkodolu un daudzkodolu šūnu relatīvā biežuma noteikšana kultūrā ir laba metode, kā kvantitatīvi noteikt ietekmi uz šūnu savairošanos un apstrādes citotoksisko vai citostatisko darbību (6), un nodrošina, ka mikroskopiski novērtētas tiek tikai šūnas, kas dalījušās apstrādes laikā vai pēc tās. Lai aplēstu apstrādes citotoksisko un citostatisko darbību,

▼M7

salīdzinot apstrādāto kultūru un kontrolkultūru vērtības, ieteicams izmantot proliferācijas indeksu pēc citokinēzes blokādes (*cytokinesis-block proliferation index — CBPI*) (6) (27) (68) vai replicēšanās indeksu (RI), kas noteikts vismaz 500 katras kultūras šūnām (sk. formulas 2. papildinājumā). Citu citotoksicitātes rādītāju (piem., šūnu integritātes, apoptozes, nekrozes, metafāzē esošu šūnu skaita, šūnas cikla) novērtēšana varētu sniegt lietderīgu informāciju, taču tos nedrīkst izmantot *CBPI* vai RI vietā.

Pētījumos bez *cytoB* ir jāpierāda, ka šūnas kultūrā ir dalījušās, lai būtiska novērtēto šūnu daļa būtu dalījušās apstrādes laikā vai pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju, citādi var iegūt pseidonegatīvus rezultātus. Lai aplēstu apstrādes citotoksicitāti un citostatisko darbību, ieteicams izmērīt populācijas relatīvo dubultošanos (*RPD*) vai šūnu skaita relatīvo pieaugumu (*RICC*) (17) (68) (69) (70) (71) (sk. formulas 2. papildinājumā). Pagarinātos paraugošanas laikos (piem., apstrādājot 1,5–2 normālus šūnas ciklus ilgi un šūnas ievācot pēc vēl 1,5–2 normāliem šūnas cikliem, kā rezultātā paraugošanas laiki kopumā pārsniedz 3–4 normālos šūnas ciklus, kā aprakstīts 38. un 39. punktā) *RPD* var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu. Tādos apstākļos piemērotāks rādītājs varētu būt *RICC* vai noderīgu aplēsi sniegtu citotoksicitātes izvērtēšana pēc 1,5–2 normāliem šūnas cikliem. Citu citotoksicitātes vai citostāzes marķieru (piem., šūnu integritāte, apoptoze, nekroze, metafāzē esošu šūnu skaits, proliferācijas indekss (*PI*), šūnas cikls, nukleoplazmatiskie tilti [*nucleoplasmic bridges*] vai kodolu pumpuri [*nuclear buds*]) novērtēšana varētu sniegt lietderīgu papildinformāciju, taču tos nedrīkst izmantot *RPD* vai *RICC* vietā.

Jāizvērtē vismaz trīs testējamās koncentrācijas (neietverot šķīdinātāju un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (pienācīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Neatkarīgi no šūnu veidiem (šūnu līnijas vai limfocītu primārās kultūras) katrā no testētajām koncentrācijām drīkst izmantot vienu vai vairākas (replikāti) apstrādātas kultūras. Kaut arī ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ir pieņemami izmantot arī vienu kultūru, ja vien gan vienas kultūras, gan duplikatīvo kultūru gadījumā tiek novērtēts tāds pats kopējais šūnu skaits. Vienas kultūras izmantošana ir īpaši aktuāla, ja vērtē vairāk nekā 3 koncentrācijas (sk. 44.–45. punktu). Rezultātus, kas pie konkrētas koncentrācijas iegūti no neatkarīgām replikātkultūrām, datu analīzei var apkopot. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas uzrāda nelielu citotoksicitāti vai nav citotoksiskas, parasti piemēroti ir koncentrācijas intervāli ar koeficientu aptuveni no 2 līdz 3. Citotoksicitātes rašanās gadījumā izvēlētajām testējamām koncentrācijām jāaptver gan tās, kuras rada citotoksicitāti, kā aprakstīts 29. punktā, gan koncentrācijas, kuras rada vidēju un nelielu citotoksicitāti vai to nerada vispār. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijas–atbildreakcijas līkne, un, lai iegūtu datus pie zemas un mērenas citotoksicitātes vai sīki izpētītu devas–atbildreakcijas sakarību, jāizmanto koncentrācijas ar maziem savstarpējiem atstatumiem un/vai vairāk nekā trīs koncentrācijas (viena kultūra vai replikāti), jo īpaši situācijās, kad eksperiments ir jāatkārto (sk. 60. punktu).

Ja maksimālā koncentrācija ir balstīta uz citotoksicitāti, ar augstāko koncentrāciju jācenšas panākt 55 ± 5 % citotoksicitāti, izmantojot ieteiktos citotoksicitātes parametrus (t. i., *RICC* un *RPD* samazinājumu šūnu līnijām, kad *cytoB* netiek izmantots, un *CBPI* vai *RI* samazinājumu, ja *cytoB* tiek izmantots, līdz 45± 5 % no paralēlās negatīvās kontroles) (72). Interpretējot pozitīvos rezultātus, kas atrodami vienīgi šā 55 ± 5 % citotoksicitātes diapazona augšgalā, jāievēro piesardzība (71).

▼M7

Mazšķīstošām testējamām ķimikālijām, kuras nav citotoksiskas pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja iegūtā citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, ka augstāka par zemāko piesātināta šķīduma koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīm redzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Pie koncentrācijas, kas rada nogulsnes, īpaši jācenšas nodrošināt, lai nogulsnes netraucētu testa norisi (piem., iekrāsošanu vai novērtēšanu). Pirms eksperimenta var būt lietderīgi noteikt šķīdību barotnē.

Ja netiek novērotas nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte, visaugstākajai testa koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (73) (74) (75). Ja testējamajai ķimikālijai nav noteikta sastāva, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģisks materiāls (*UVCB*) (76), no vides ekstrahēts produkts u. c., lai palielinātu katra komponenta koncentrāciju, visaugstākajai koncentrācijai, iespējams, vajadzēs būt vēl lielākai (piem., 5 mg/ml), ja nav pietiekamas citotoksicitātes. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēku zālēm šīs prasības var būt citādas (93).

Kontroles

Paralēlas negatīvās kontroles (sk. 21. punktu) — šķīdinātāju apstrādes barotnē — iekļauj par katru šūnu ievākšanas reizi, un ar tām rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes kultūrām.

Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt klastogēnus izmantotā testa protokola apstākļos un attiecīgā gadījumā eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti. Pozitīvo kontroļu piemēri ir sniegti tālāk 1. tabulā. Pamatotos gadījumos var izmantot alternatīvas pozitīvās kontroles ķimikālijas.

Patlaban nav zināms neviens aneigēns, kam vajadzīga metaboliska aktivācija, lai tas kļūtu genotoksiski aktīvs (17). Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti īstermiņa apstrādēm, kas tiek veiktas paralēli ar metabolisko aktivāciju un bez tās, izmantojot tādu pašu apstrādes ilgumu, pozitīvās kontroles var izmantot vien attiecībā uz klastogēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Tādā gadījumā viena klastogēniska pozitīvās kontroles atbildreakcija pierādīs gan metabolisma aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Taču attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi (bez S9) jānodrošina atsevišķas pozitīvās kontroles, jo apstrādes ilgums atšķirsies no testa, kurā izmantota metaboliskā aktivācija. Ja klastogēnu izvēlas par vienīgo pozitīvo kontroli īstermiņa apstrādei ar metabolisko aktivāciju un bez tās, attiecībā uz ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas jāizvēlas aneigēns. Metaboliski kompetentām šūnām, kurām nav nepieciešams S9, izmanto gan klastogenitātes un aneigenitātes pozitīvās kontroles.

Katra pozitīvā kontrole jāizmanto pie vienas vai vairākām koncentrācijām, ar kurām paredzēts radīt reproducējamus un detektējamus pieaugumus virs fona līmeņa, lai parādītu testa sistēmas jutību (t. i., ietekme ir skaidri redzama, taču nolasītājs nevar uzreiz atklāt kodēto priekšmetstikliņu identitāti), un atbildreakciju nedrīkst traucēt testēšanas metodē noteikto citotoksicitātes robežu pārsniegumi.

▼M7

1. tabula.

Standartķimikālijas, kuras ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanā un pozitīvo kontroļu atlasē

Kategorija	Ķimikālija	*CAS* Nr.
1. **Klastogēni, kuriem metabolisma aktivācija nav vajadzīga**		
	Metilmetānsulfonāts	66-27-3
	Mitomicīns C	50-07-7
	4-nitrohinolīn-N-oksīds	56-57-5
	Citozīnarabinozīds	147-94-4
2. **Klastogēni, kam metaboliskā aktivācija ir vajadzīga**		
	Benz(a)pirēns	50-32-8
	Ciklofosfamīds	50-18-0
3. **Aneigēni**		
	Kolhicīns	64-86-8
	Vinblastīns	143-67-9

PROCEDŪRA

Apstrādes kārtība

Lai palielinātu varbūtību, ka tiks detektēta aneigēna vai klastogēna darbība konkrētā šūnas cikla posmā, ir svarīgi ar testējamo ķimikāliju apstrādāt pietiekamu skaitu šūnu, kas reprezentē visus šūnas cikla posmus. Visām apstrādēm jāsākas un jābeidzas laikā, kad šūnas aug eksponenciāli, un šūnu augšanai jāturpinās līdz pat paraugošanas brīdim. Tādējādi šūnu līniju un primāro šūnu kultūru apstrādes grafiki var mazliet atšķirties no to limfocītu apstrādes grafika, jo limfocītu šūnas cikla ierosināšanai jāveic mitogēnā stimulācija (17). Attiecībā uz limfocītiem visefektīvākā pieeja ir apstrādi ar testējamo ķimikāliju sākt 44–48 stundas pēc stimulēšanas ar *PHA*, kad šūnas dalās asinhroni (6).

Publicētie dati (19) norāda, ka lielākā daļa aneigēnu un klastogēnu tiks detektēti 3–6 stundu īstermiņa periodā gan S9 klātbūtnē, gan bez tā, kam seko testējamās ķimikālijas noņemšana un paraugošana laikā, kas atbilst aptuveni 1,5-2,0 normāliem šūnas cikliem pēc apstrādes sākuma (7).

Tomēr, lai veiktu pilnīgu izvērtēšanu, kas būtu vajadzīga, lai secinātu, ka rezultāts ir negatīvs, jāizpilda visi trīs turpmāk norādītie eksperimentālie nosacījumi, veicot īstermiņa apstrādi gan ar metabolisko aktivāciju, gan bez tās un ilgtermiņa apstrādi bez metaboliskās aktivācijas (sk. 56., 57. un 58. punktu):

— šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai bez metaboliskās aktivācijas, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli (19),

— šūnas 3–6 stundas eksponē testējamai ķimikālijai ar metabolisko aktivāciju, un paraugošanu veic tad, kad kopš apstrādes sākuma apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli (19),

▼M7

— šūnas nepārtraukti eksponē bez metaboliskās aktivācijas līdz paraugošanai, ko veic tad, kad apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāli šūnas cikli.

Gadījumos, kad kāds no iepriekš norādītajiem eksperimentālajiem nosacījumiem rada pozitīvu atbildreakciju, nav vajadzības veikt pētījumus ar pārējiem apstrādes režīmiem.

Ja ir zināms vai ir aizdomas par to, ka testējamā ķimikālija ietekmē šūnas cikla garumu (piem., ja testē nukleozīdu analogus), jo īpaši attiecībā uz p53 kompetentām šūnām (35) (36) (77), paraugošanas vai rekuperācijas laikus var pagarināt par vēl 1,5–2,0 normāliem šūnas cikliem (t. i., kopumā 3,0–4,0 šūnas cikliem pēc īstermiņa un ilgtermiņa apstrāžu sākuma). Tas attiecas uz situācijām, kurās var būt bažas par iespējamo mijiedarbību starp testējamo ķimikāliju un *cytoB*. Izmantojot pagarinātus paraugošanas laikus (t. i., kopumā 3,0–4,0 šūnas ciklu laikus), jārūpējas, lai šūnas joprojām aktīvi dalītos. Piemēram, limfocītu eksponenciālā augšana 96 stundas pēc stimulācijas var samazināties un šūnu monoslāņu kultūras var kļūt konfluentas.

Ieteiktās šūnu apstrādes kārtības kopsavilkums ir sniegts 2. tabulā. Šo vispārīgo apstrādes kārtību var modificēt (tas jāpamato) atkarībā no testējamās ķimikālijas stabilitātes vai reaģētspējas vai no izmantoto šūnu augšanas īpatnībām.

2. tabula

Šūnu apstrādes un ievākšanas laiks *MNvit* testā

Limfocīti, primārās šūnas un šūnu līnijas ar*cytoB*	+ S9 Īsā apstrāde	3–6 stundas apstrādā S9 klātbūtnē; aizvāc S9 un apstrādes barotni; pievieno svaigu barotni un *cytoB*; šūnas ievāc 1,5–2,0 normālos šūnas ciklus pēc apstrādes sākuma.
	– S9 Īsā apstrāde	Apstrādā 3–6 stundas; aizvāc apstrādes barotni; pievieno svaigu barotni un *cytoB*; šūnas ievāc 1,5–2,0 normālos šūnas ciklus pēc apstrādes sākuma.
	– S9 Pagarināta apstrāde	1,5–2 normālus šūnas ciklus ilgi šūnas apstrādā *cytoB* klātbūtnē; šūnas ievāc apstrādes perioda beigās.
Šūnu līnijas, ko apstrādā bez *cytoB* (Apstrāde identiska iepriekš aprakstītajai, taču bez *cytoB* pievienošanas.)		

Monoslāņa kultūrās 3–6 stundu apstrādes beigās var būt mitotiskās šūnas (ko var atpazīt pēc tā, ka tās ir apaļas un atdalās no virsmas). Tā kā mitotiskās šūnas viegli atdalās, tās var tikt nejauši aizvāktas kopā ar testējamo ķimikāliju saturošo barotni. Ja konstatē mitotisko šūnu skaita būtisku pieaugumu salīdzinājumā ar kontrolēm, kas norāda uz ticamu mitozes apstāju, šīs šūnas centrifugējot jāsavāc un jāievieto atpakaļ kultūrās, lai izvairītos no mitozes fāzes un mikrokodolus saturošu / hromosomu aberācijas riska šūnu zuduma ievākšanas laikā.

▼M7

Šūnu ievākšana un priekšmetstikliņu sagatavošana

Šūnas no katras kultūras savāc un apstrādā atsevišķi. Šūnu preparātu sagatavošana var ietvert hipotonisku apstrādi, bet tā nav nepieciešama, ja pietiekamu šūnu izklājumu panāk citā veidā. Var izmantot dažādus priekšmetstikliņu sagatavošanas paņēmienus, ja vien vērtēšanas vajadzībām tiek iegūti augstas kvalitātes šūnu preparāti. Lai būtu iespējams detektēt mikrokodolus un (ja izmanto citokinēzes blokādi) droši identificēt divkodolu šūnas, jāpatur šūnas ar neskartu šūnas membrānu un neskartu citoplazmu.

Priekšmetstikliņus iekrāsot var ar dažādām metodēm, piem., Gimzas krāsvielu vai fluorescentām DNS specifiskām krāsvielām. Lietojot atbilstošas fluorescentas krāsvielas (piem., akridīnoranžo (78) vai *Hoechst* 33258 ar pironīnu Y (79)), iespējams izvairīties no daļas artefaktu, kas saistīti ar DNS nespecifisku krāsvielu izmantošanu. Ja vajadzīga informācija par to veidošanās mehāniku, mikrokodolu saturu var identificēt ar antikinetohoru antivielu metodi, *FISH* ar pancentromēriskām DNS zondēm vai *in situ* iezīmēšanu ar pancentromērspecifiskiem praimeriem kombinācijā ar DNS iekrāsošanu ar kontrasta krāsvielu (veselas hromosomas tiek iekrāsotas, bet acentriski hromosomu fragmenti iekrāsoti netiek) (16) (17). Ja ir pierādīta to efektivitāte un tās ir validētas, var izmantot citas klastogēnu un aneigēnu diferenciācijas metodes. Piemēram, attiecībā uz atsevišķām šūnu līnijām noderīgu informāciju varētu sniegt arī sub-2N kodolu kā hipodiploīdu pārmaiņu mērījumi ar tādiem paņēmieniem paņēmieni kā attēlu analīze, lāzerskenēšanas citometrija vai plūsmas citometrija (80) (81) (82). Arī morfoloģiski kodolu novērojumi var liecināt par iespējamu aneiploīdiju. Turklāt arī metafāzes hromosomu aberāciju tests, vēlams, ar tāda paša tipa šūnām un protokolu ar salīdzināmu jutību, var būt noderīgs veids, kā noteikt, vai mikrokodoli ir radušies hromosomu pārrāvumu dēļ (zinot, ka hromosomu zudums hromosomu aberāciju testā netiktu detektēts).

Analīze

Visi priekšmetstikliņi, tostarp no šķīdinātāja un neapstrādātajām (ja tādas ir) un pozitīvajām kontrolēm, pirms mikrokodolu sastopamības mikroskopiskās analīzes neatkarīgi jākodē. Lai kontrolētu jebkādus pārvērtējumus vai novirzes, izmantojot automātisku uzskaites sistēmu, piem., plūsmas citometriju, lāzerskenēšanas citometriju vai attēlu analīzi, jāizmanto pienācīgi paņēmieni. Neatkarīgi no tā, vai mikrokodolu uzskaitei tiek vai netiek izmantota automātiskā platforma, paralēli jānovērtē *CBPI*, RI, *RPD* vai *RICC*.

Ar *cytoB* apstrādātās kultūrās mikrokodolu biežums jāanalizē vismaz 2000 divkodolu šūnu pie katras koncentrācijas (83), kas vienlīdzīgi sadalītas starp replikātiem, ja izmanto replikātus. Ja katrai devai izmanto tikai vienu kultūru (sk. 28. punktu), tajā jānovērtē vismaz 2000 divkodolu šūnu no vienas kultūras (83). Ja pie katras koncentrācijas novērtēšanai ir pieejamas ievērojami mazāk nekā 1 000 divkodolu šūnu no katras kultūras (duplikatīvu kultūru gadījumā) vai 2000 divkodolu šūnu (vienas kultūras gadījumā) un ja nav detektēts ievērojams mikrokodolu skaita pieaugums, testēšana jāatkārto ar lielāku daudzumu šūnu vai ar mazāk citotoksiskām koncentrācijām atkarībā no tā, kas ir piemērotāk. Jāraugās, lai nevērtētu divkodolu šūnas ar neregulāru formu vai tādas, kuru

▼M7

abi kodoli pēc lieluma ir ļoti nevienādi. Turklāt nedrīkst divkodolu šūnas sajaukt ar sliktā izklājumā esošām daudzkodolu šūnām. Šūnas, kas satur vairāk nekā divus galvenos kodolus, attiecībā uz mikrokodoliem nav jāanalizē, jo šajās šūnās mikrokodolu bāzlīnijas biežums var būt lielāks (84). Vienkodola šūnu vērtēšana ir pieņemama tad, ja ir pierādīts, ka testējamā ķimikālija maina *cytoB* aktivitāti. Šādos gadījumos var būt lietderīgi testu atkārtot, neizmantojot *cytoB*. Papildus divkodolu šūnām vērtējot daudzkodolu šūnas, var iegūt lietderīgu informāciju (85) (86), bet tas nav jāveic obligāti.

Bez *cytoB* testētās šūnu līnijās mikrokodolus uzskaita vismaz 2000 šūnu katrā testa koncentrācijā un kontrolē (83), kas vienlīdzīgi sadalītas starp replikātiem, ja replikātus izmanto. Kad pie katras koncentrācijas tiek izmantota viena kultūra (sk. 28. punktu), šajā vienā kultūrā jāuzskaita vismaz 2000 šūnu. Ja pie katras koncentrācijas novērtēšanai ir pieejamas ievērojami mazāk nekā 1 000 šūnu katrā kultūrā (duplikatīvu kultūru gadījumā) vai 2000 šūnu (vienas kultūras gadījumā) un ja nav detektēts ievērojams mikrokodolu skaita pieaugums, testēšana jāatkārto ar lielāku daudzumu šūnu vai ar mazāk citotoksiskām koncentrācijām atkarībā no tā, kas ir piemēroti.

Ja lieto *cytoB*, jānosaka *CBPI* vai *RI*, lai novērtētu šūnu savairošanos (sk. 2. papildinājumu), izmantojot vismaz 500 šūnu no katras kultūras. Ja apstrādi veic bez *cytoB*, ir būtiski pierādīt, ka šūnas kultūrā ir dalījušās, kā aprakstīts 24.–28. punktā.

Laboratorijas kompetence

Lai pirms testa regulāras izmantošanas pierādītu, ka laboratorijai ir pietiekama pieredze ar šo testu, laboratorijai jāveic virkne eksperimentu ar pozitīvās kontroles standartķimikālijām, kurām ir dažādi iedarbības mehānismi (vismaz vieni no tām jābūt ar metabolisko aktivāciju un vienai bez tās, un vienai ar aneigēnu iedarbības mehānismu, izraudzītām no 1. tabulā uzskaitītajām ķimikālijām), un dažādām negatīvajām kontrolēm (tostarp neapstrādātām kultūrām un dažādiem šķīdinātājiem/nesējiem). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāatbilst literatūrai. Tas neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 49.–52. punktā.

Lai pierādītu kompetenci detektēt klastogēniskās un aneigēniskās ķimikālijas, noteiktu metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un pierādītu novērtēšanas procedūru (mikroskopiskās vizuālās analīzes, plūsmas citometrijas, lāzerskenēšanas citometrijas vai attēlu analīzes) piemērotību, pozitīvās kontroles ķimikāliju izlase (sk. 1. tabulu) jāpēta ar īsām un garām apstrādēm bez metaboliskās aktivācijas un ar īsu apstrādi ar metabolisko aktivāciju. Atlasīto ķimikāliju koncentrāciju klāsts jāizvēlas tā, lai radītu reproducējamus un ar koncentrācijām saistītus pieaugumus virs fona līmeņa un tā pierādītu testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Laboratorijā jānosaka:

— vēsturisko pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisko negatīvo (neapstrādāto, šķīdinātāja) kontroļu diapazons un sadalījums.

Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par negatīvajām kontrolēm, ja tādi ir. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar arvien lielāku daudzumu eksperimentālo datu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % minētā sadalījuma kontroles robežās (87) (88). Laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datu bāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tā sastāvētu no vismaz 20 eksperimentiem, kas veikti salīdzināmos eksperimenta apstākļos. Lai noteiktu laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu

▼M7

datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija ‘tiek kontrolēta’ (83), laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (88)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrētā eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (87).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

Negatīvo kontroļu datos jāietver informācija par to, cik bieži vienīgajā kultūrā vai visās replikātkultūrās kopā sastopamas šūnas ar mikrokodoliem, kā aprakstīts 28. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt 95 % laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma kontroles robežās. Ja dati no paralēlajām negatīvajām kontrolēm neietilpst 95 % kontroles robežās, tie var būt pieņemami iekļaušanai vēsturisko kontroļu sadalījumā, ja vien šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ir pierādījumi, ka testa sistēma ‘tiek kontrolēta’ (skatīt 37. punktu) un ka nav pieļautas tehniskas vai cilvēka kļūdas.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu izklāsts

Ja izmanto citokinēzes bloķēšanas paņēmienu, mikrokodolu inducēšanos novērtē tikai pēc tā, cik biežas ir divkodolu šūnas ar mikrokodoliem (neatkarīgi no mikrokodolu skaita šūnā). Vienu, divu vai vairāku mikrokodolus saturošo šūnu skaitu pārskatā var norādīt atsevišķi, un tas var sniegt noderīgu informāciju, bet tāda uzskaite nav jāveic obligāti.

Jānosaka paralēlie citotoksicitātes un/vai citostāzes rādītāji visām apstrādātajām kultūrām, negatīvās un pozitīvās kontroles kultūrām (16). Ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodi, visām apstrādātajām un kontrolkultūrām kā šūnas cikla aizkaves rādītājs jāaprēķina *CBPI* vai *RI*. Ja *cytoB* nav, izmanto *RPD* vai *RICC* (sk. 2. papildinājumu).

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

— paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 50. punktā,

— paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 50. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas laboratorijas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,

— šķīdinātāja kontrolē ir izpildīti šūnu savairošanās kritēriji (25.–27. punkts),

— ja vien vienam no tiem nav bijis pozitīvs rezultāts, ir testēti visi eksperimentālie nosacījumi (36.–40. punkts),

— analizējams ir bijis pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits (28. punkts un 44.–46. punkts),

▼M7

— maksimālās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 24.–31. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, ja kādā no izvērtētajiem eksperimentālajiem nosacījumiem (sk. 36.–39. punktu):

— vismaz vienai no testējamām koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums (89),

— šo pieaugumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, vismaz viena eksperimenta nosacījuma gadījumā ir konstatējama pieauguma sakarība ar devu (sk. 28. punktu),

— kāds no rezultātiem atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., 95 % kontroles robežām pēc Puasona sadalījuma).

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomas pārrāvumus un/vai rādītāja palielinājumu vai samazinājumu. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (90) (91) (92).

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, ja visos izvērtētajos eksperimentālajos nosacījumos (sk. 36.–39. punktu):

— nevienai no testējamām koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,

— visi rezultāti atrodas vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontroles robežās pēc Puasona sadalījuma; sk. 52. punktu).

Testējamo ķimikāliju tad uzskata par nespējīgu šajā testa sistēmā inducēt hromosomu pārrāvumus un/vai papildinājumu vai zaudējumu. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami arī literatūrā (90) (91) (92).

Nav prasības viennozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne viennozīmīgi negatīva, ne viennozīmīgi pozitīva, kā aprakstīts iepriekš, un/vai lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot mainītus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp koncentrācijām, citus metaboliskās aktivācijas apstākļus (t. i., S9 koncentrāciju vai S9 izcelsmi)).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, tas ir neskaidrs.

Testējamās ķimikālijas var inducēt mikrokodolu veidošanos *MNvit* testā tāpēc, ka tās inducē hromosomu pārrāvumus, hromosomu zaudējumu vai abus kopā. Var veikt papildu analīzi ar antikinetohoru antivielām vai centromēriem specifiskām *in situ* zondēm vai izmantot citas metodes, lai noteiktu, vai mikrokodolu inducēšanas mehānisms ir saistīts ar klastogēnu un/vai aneigēnu aktivitāti.

▼M7

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma,

— testējamās ķimikālijas spēja reaģēt ar šķīdinātāju/nesēju vai šūnu barotni,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,

— pH, osmolalitātes un nogulšņu mērījums barotnē, kurā testējamā ķimikālija tika pievienota (attiecīgā gadījumā).

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— ciktāl iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izvēles pamatojums,

— šķīdinātāja īpatsvars galīgajā barotnē.

Šūnas:

— izmantoto šūnu tips un avots,

— izmantotā šūnu tipa piemērotība,

— šūnu līnijām — mikoplazmas neesība,

— šūnu līnijām — informācija par šūnu cikla garumu vai proliferācijas indekss,

— ja izmanto limfocītus — asins donoru dzimums, vecums un visa relevantā informācija par donoru, nesadalītas asinis vai atdalīti limfocīti, izmantotais mitogēns,

— normālais šūnas cikla ilgums (negatīvā kontrole),

— šūnu līnijām — ja pieejams, pasāžu skaits,

— šūnu līnijām — šūnu kultūru uzturēšanas metodes,

— šūnu līnijām — modālais hromosomu skaits.

▼**M7**

Testēšanas apstākļi:

— ja izmanto citokinēzes bloķētāju (piem., *cytoB*), vielas identitāte, koncentrācija un šūnu ekspozīcijas ilgums,

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija barotnē (piem., barotnes μg vai mg/mL, vai mM),

— vielas koncentrāciju un šūnu kultūru skaita izvēles pamatojums, piem., dati par citotoksiskajām īpašībām un šķīdības robežām,

— barotnes sastāvs, attiecīgā gadījumā CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,

— barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai daudzums),

— inkubācijas temperatūra un ilgums,

— apstrādes ilgums,

— šūnu ievākšanas laiks pēc apstrādes,

— attiecīgā gadījumā šūnu blīvums uzsēšanas laikā,

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā barotnē, S9 kvalitātes kontroles (piem., fermenta aktivitāte, sterilitāte, metaboliskā spēja),

— pozitīvās un negatīvās kontroles ķimikālijas, galīgās koncentrācijas, apstrādes un rekuperācijas periodu apstākļi un ilgums;

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes un izmantotais šūnu iekrāsošanas paņēmiens,

— mikrokodolus saturošu šūnu novērtēšanas kritēriji (analizējamo šūnu izvēle un mikrokodolu identificēšana),

— analizēto šūnu skaits,

— citotoksicitātes mērīšanas metodes,

— jebkāda papildu informācija, kas attiecas uz citotoksicitāti un izmantoto metodi,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

— izmantotā(-s) statistiskās analīzes metode(-s),

— metodes, piemēram, tādas kā kinetohoru antivielas vai pancentromērspecifisko zonžu izmantošana, lai noskaidrotu, vai mikrokodoli satur veselas vai fragmentētas hromosomas (attiecīgā gadījumā).

— pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— analīzei pieņemamo šūnu definīcija,

— ja neizmanto *cytoB* — apstrādāto šūnu skaits un ievākto šūnu skaits katrai kultūrai, ja tiek izmantotas šūnu līnijas,

▼M7

— izmantotais citotoksicitātes rādītājs, piemēram, *CBPI* vai *RI*, ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodi; *RICC* vai *RPD*, ja citokinēzes bloķēšanas metodes neizmanto; citi novērojumi, ja tādi ir (piem., šūnu konfluence, apoptoze, nekroze, metafāzē esošo šūnu skaits, divkodolu šūnu biežums),

— izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks,

— dati par apstrādes barotnes pH un osmolalitāti, ja tie noteikti,

— vienkodola, divkodolu un daudzkodolu šūnu izkliede, ja izmanto citokinēzes bloķēšanas metodi,

— par katru apstrādāto kultūru un kontrolkultūru atsevišķi norādīts to šūnu skaits, kurām ir mikrokodoli, un norāde, vai mikrokodoli ir no divkodolu vai no vienkodola šūnām (attiecīgā gadījumā),

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

— paralēlās negatīvās (šķīdinātāja) un pozitīvās kontroles dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātāja) un pozitīvo kontroļu dati, diapazoni, vidējās vērtības un standartnovirzes, 95 % sadalījuma kontroles robežas, kā arī datu skaits,

— statistiskā analīze; p-vērtības (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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*, Vol. 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, 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) Šā pielikuma B.10. nodaļa "Zīdītāju hromosomu aberāciju *in vitro* tests".

(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 fur 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 Res*earch, 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 Res*earch, 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 Pharmacol*ogy, 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*, Vol. 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, pieejams: 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. Pieejams: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). 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*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby 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) Elliott, 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. *et al*. (1976). "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *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). Pieejams: 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. *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 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. II. 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). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, 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. Pieejams pēc pieprasījuma.

▼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*, Vol. 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*, Vol. 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*, Vol. 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, No.198, OECD Publishing, Paris.

(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. *et al*. (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', in *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. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneigēns: jebkura ķimikālija vai process, kas mijiedarbībā ar mitotiskā un mejotiskā šūnu dalīšanās cikla aparāta komponentiem izraisa šūnu vai organismu aneiploīdiju.

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Apoptoze: programmēta šūnu nāve, ko raksturo virkne posmu, kuros šūnas sabrūk membrānās ieslēgtās daļiņās, kas pēc tam tiek iznīcinātas fagocitozē vai izvadītas.

Šūnu savairošanās: šūnu skaita pieaugums šūnu mitotiskās dalīšanās rezultātā.

Centromērs: hromosomas DNS reģions, kurā abas hromatīdas ir saistītas un uz kura sānu pie sāna piestiprinājušies abi kinetohori.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Koncentrācijas: testējamās ķimikālijas galīgās koncentrācijas barotnē.

Klastogēns: jebkura ķimikālija vai notikums, kas izraisa strukturālas hromosomas tipa aberācijas šūnu vai eikariotu populācijās.

Citokinēze: šūnas dalīšanās process, kurš notiek tūlīt pēc mitozes un kurā izveidojas divas meitšūnas, katra ar savu kodolu.

Proliferācijas indekss pēc citokinēzes blokādes (*CBPI*): otrā dalīšanās viļņa šūnu īpatsvars apstrādātajā populācijā salīdzinājumā ar neapstrādāto kontroli (formulu sk. 2. papildinājumā).

Citostāze: šūnu augšanas inhibēšanās (formulu sk. 2. papildinājumā).

Citotoksicitāte: šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros izmanto citohalazīnu B, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu proliferācijas indeksa pēc citokinēzes blokādes (*CBPI*) vai replicēšanās indeksa (RI) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 26. punktu un 2. papildinājumu).

Šajā testēšanas metodē ietvertajiem testiem, kuros citohalazīnu B neizmanto, citotoksicitāte ir apstrādāto šūnu populācijas relatīvās dubultošanās (*RPD*) vai šūnu skaita relatīvā pieauguma (*RICC*) samazinājums salīdzinājumā ar negatīvo kontroli (sk. 27. punktu un 2. papildinājumu).

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp pārrāvumus, delēcijas, aduktus, nukleotīdu modifikācijas un saiknes, pārkārtojumus, gēnu mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai pastāvīgus hromosomu bojājumus.

Interfāzes šūnas: šūnas, kas neatrodas mitotiskajā stadijā.

Kinetohors: proteīnstruktūra, kura sagrupējas pie centromēra hromosomā un ar kuru šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstas šķiedras, nodrošinot meithromosomu pareizu pārvietošanos uz meitšūnu poliem.

▼M7

Mikrokodoli: mazi kodoli, kas mitozes vai mejozes telofāzē izveidojas no aizkavējušos hromosomu fragmentiem vai veselām hromosomām atsevišķi no šūnu galvenajiem kodoliem un tiem papildus.

Mitoze: šūnas kodola dalīšanās process, kuru parasti sīkāk iedala šādās stadijās: profāze, prometafāze, metafāze, anafāze un telofāze.

Mitotiskais indekss: metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo šūnu savairošanās pakāpi šajā populācijā.

Mutagēns: faktors, kas izraisa pārmantojamas DNS bāzu pāru sekvences vai sekvenču izmaiņas gēnos vai hromosomu struktūrā (hromosomu aberācijas).

Neatdalīšanās: pārhromatīdu neatdalīšanās un pienācīga nevirzīšanās uz topošajām meitšūnām, kas noved pie anormāla hromosomu skaita meitšūnās.

p53 statuss: p53 proteīns ir iesaistīts šūnas cikla regulēšanā, apopotozē un DNS reparācijā. Šūnām, kurām funkcionāla p53 proteīna nav un kuras tāpēc nespēj, reaģējot uz DNS bojājumiem, apturēt šūnas ciklu vai likvidēt bojātās šūnas ar apoptozi vai citiem paņēmieniem (piem., inducējot DNS reparāciju), kas saistīti ar p53 funkcijām, teorētiski vajadzētu būt uzņēmīgākām pret gēnu mutācijām vai hromosomu aberācijām.

Poliploīdija: tāda hromosomu skaita aberācija šūnās vai organismos, kas skar veselu(-s) hromosomu komplektu(-s) (pretstatā aneiploīdijai, kas skar vienu vai vairākas atsevišķas hromosomas).

Proliferācijas indekss (*PI*): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Šūnu skaita relatīvais pieaugums (*RICC*): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Populācijas relatīvā dubultošanās (*RPD*): citotoksicitātes mērīšanas metode, ja neizmanto *cytoB* (formulu sk. 2. papildinājumā).

Replicēšanās indekss (RI): pabeigtu šūnu dalīšanās ciklu daļa apstrādātā kultūrā ekspozīcijas un rekuperācijas laikā attiecībā pret neapstrādāto kontroli (formulu sk. 2. papildinājumā).

S9 aknu frakcija: aknu homogenāta supernatants pēc 9 000 g centrifugēšanas, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: S9 aknu frakcijas un metabolisko fermentu darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins to kontrolkultūru apzīmēšanai, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām paralēli izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

▼M7

2. papildinājums

CITOTOKSICITĀTES NOVĒRTĒJUMA FORMULAS

Ja izmanto cytoB, citotoksicitātes izvērtējuma pamatā ir **proliferācijas indekss pēc citokinēzes blokādes (*CBPI*)** vai **replicēšanās indekss (RI)** (17) (69). *CBPI* norāda mikrokodolu vidējo skaitu vienā šūnā, un to var izmantot šūnu savairošanās aprēķinos. RI norāda šūnas ciklu relatīvo skaitu vienai šūnai laikā, kad apstrādātajās kultūrās tā tiek eksponēta *cytoB*, salīdzinājumā ar kontrolkultūrām, un to var izmantot, lai aprēķinātu % citostāzi:

$$\% \text{ citostāze} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

un:

T = ar testējamo ķimikāliju apstrādātā kultūra

C = kontrolkultūra

kur:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{No.mononucleate cells}) + (2 \times \text{No.binucleate cells}) + (3 \times \text{No.multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

Tātad *CBPI* vērtība 1 (visas šūnas ir vienkodola šūnas) ir līdzvērtīga 100 % citostāzei.

Citostāze = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{No.binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells}))/(\text{Total number of cells})_T}{((\text{No.binucleate cells}) + (2 \times \text{No.multinucleate cells}))/(\text{Total number of cells})_C} \times 100$$

T = apstrādātās kultūras

C = kontrolkultūras

Tātad, ja RI ir 53 %, tas nozīmē, ka, salīdzinot ar kontrolkultūras šūnu skaitu, kuras dalījušās, izveidojot divkodolu un daudzkodolu šūnas, apstrādātajā kultūrā šādi dalījušies tikai 53 % no tāda paša šūnu skaita, t. i., 47 % citostāze.

Ja* cytoB *neizmanto, citotoksicitātes izvērtējuma pamatā ieteicams likt **šūnu skaita relatīvā pieauguma (*RICC*)** vai **populācijas relatīvās dubultošanās (*RPD*)** rādītājus (69), jo tie abi ņem vērā, kāda šūnu populācijas daļa ir dalījusies.

$$\textbf{RICC}(\textbf{\%}) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{ncrease in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\textbf{\%}) = \frac{(\text{No.of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No.of population doublings in control cultures})} \times 100$$

kur:

Populācijas dubultošanās = [log (šūnu skaits pēc apstrādes ÷ šūnu skaits sākumā)] ÷ log 2

Tātad, ja *RICC* vai *RPD* ir 53 %, tas uzrāda 47 % citotoksicitāti/citostāzi.

▼M7

Ar **proliferācijas indeksu (*PI*)** citotoksicitāti var novērtēt, saskaitot klonus, ko veido 1 šūna (cl1), 2 šūnas (cl2), 3 līdz 4 šūnas (cl4) un 5 līdz 8 šūnas (cl8).

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

PI tiek izmantots par vērtīgu un ticamu citotoksicitātes parametru arī šūnu līnijām, kas kultivētas *in vitro* bez *cytoB* (35) (36) (37) (38), un to var uzskatīt par lietderīgu papildu parametru.

Jebkurā gadījumā pirms apstrādes šūnu skaitam apstrādātajās kultūrās un negatīvās kontroles kultūrās jābūt vienādam.

Kaut arī iepriekš par citotoksicitātes parametru ticis izmantots *RCC* (t. i., šūnu skaits apstrādātajās kultūrās/šūnu skaits kontrolkultūrās), to izmantot vairs nav ieteicams, jo tas var citotoksicitāti novērtēt pārāk zemu.

Izmantojot automātiskas novērtēšanas sistēmas, piem., plūsmas citometriju, lāzerskenēšanas citometriju vai attēlu analīzi, šūnu skaitu formulā var aizstāt ar mikrokodolu skaitu.

Negatīvās kontroles kultūrās populācijas dubultošanās vai replicēšanās indeksam jābūt saderīgam ar prasību šūnu paraugošanu veikt tad, kad pēc apstrādes apritējuši aptuveni 1,5–2,0 normāliem šūnas cikli.

▼M3

B.50. **ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (LLNA:DA)**

IEVADS

1. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas un ES testēšanas metodes tiek regulāri pārskatītas, ņemot vērā tehnikas attīstību, regulatīvo prasību izmaiņas un dzīvnieku labturības apsvērumus. Ir pārskatīta B.42 – pirmā no testēšanas metodēm (TM) ādas sensibilizācijas noteikšanai pelēm jeb lokālo limfmezglu noteikšanas metode (*LLNA*; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas) (1). Ir publicēti *LLNA* validācijas un ar to saistītā darba pārskati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Lai mērītu limfocītu savairošanos, *LLNA* izmanto radioizotopisko timidīnu vai jodīnu, un tāpēc šīs metodes pielietošana ir ierobežota gadījumos, kad radioaktīvo komponentu iegāde, izmantošana vai apglabāšana ir problemātiska. *LLNA:DA* (izstrādātājs: *Daicel Chemical Industies Ltd.*) ir modificēta *LLNA*, kurā nav radioaktīvo komponentu un ar kuru kvantitatīvi nosaka adenozīntrifosfāta (ATP) saturu, par limfocītu savairošanās indikatoru izmantojot bioluminiscenci. *LLNA:DA* testēšanas metode ir validēta, to ir pārskatījusi starptautiska salīdzinošās izvērtēšanas komisija un ir rekomendējusi šo metodi kā tādu, kas ar dažiem ierobežojumiem uzskatāma par noderīgu ādu sensibilizējošu un nesensibilizējošu ķīmisku vielu identificēšanai (10) (11) (12) (13). Šī TM ir izstrādāta, lai novērtētu ķīmiskām vielām vai to maisījumiem piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu (dzīvniekiem). Šā pielikuma B.6. nodaļā un ESAO 406. testēšanas vadlīnijās aprakstītā metode izmanto testēšanu ar jūrascūciņām, proti, maksimizācijas testu jūrascūciņām un Bīlera testu (14). *LLNA* (šā pielikuma B.42. nodaļa; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, *LLNA:DA* (šā pielikuma B.50. nodaļa; ESAO 442.a testēšanas vadlīnijas) un *LLNA:BrdU-ELISA* (šā pielikuma B.51. nodaļa; ESAO 442.b testēšanas vadlīnijas), visas ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām, kas aprakstītas B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijās (14), dzīvnieku skaita samazinājuma un labāka izmantojuma ziņā.

2. Līdzīgi kā *LLNA*, ar *LLNA:DA* pēta ādas sensibilizācijas indukcijas fāzi un sniedz kvantitatīvus datus, kas piemēroti atbildes reakcijas uz devu novērtēšanai. Turklāt iespēja noteikt ādas sensibilizatorus, neizmantojot radioaktīvus DNS marķierus, atbrīvo no vajadzības risināt arodapstarošanas un radioaktīvo atkritumu apglabāšanas jautājumus. Tas savukārt ļauj ādas sensibilizatoru noteikšanai biežāk izmantot peles un turpināt samazināt jūrascūciņu izmantošanu ādas sensibilizācijas potenciāla testēšanā (t. i., B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (14).

DEFINĪCIJAS

3. Definīcijas skatīt 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *LLNA:DA* metode ir modificēta *LLNA*, kura paredzēta ķīmisko vielu – potenciālu ādas sensibilizatoru identificēšanai un kurai ir zināmi ierobežojumi. Tas nenozīmē, ka visos gadījumos *LLNA:DA* būtu jālieto *LLNA* vai jūrascūciņu testa vietā (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (14), bet gan to, ka šī noteikšana ir minētajam testam līdzvērtīga un to var izmantot kā alternatīvu, kuras pozitīvajam vai negatīvajam rezultātam vairs nav vajadzīgs papildu apstiprinājums (10) (11). Pirms uzsākt pētījumus, testēšanas laboratorijai jāņem vērā visa par testējamo vielu pieejamā informācija. Pie

▼M3

šādas informācijas pieder testējamās vielas identifikācija un ķīmiskā struktūra, fizikāli ķīmiskās īpašības, citu *in vitro* vai *in vivo* veikto toksicitātes testu rezultāti un toksikoloģiskie dati par struktūras ziņā saistītām vielām. Šī informācija jāizvērtē, lai noteiktu *LLNA:DA* piemērotību konkrētajai testējamai vielai (ņemot vērā atsevišķu veidu vielu nesaderību ar *LLNA:DA*; skatīt 5. punktu) un lai izraudzītos pareizu testējamās vielas devu.

5. *LLNA:DA* ir *in vivo* metode un kā tāda paredz dzīvnieku izmantošanu alerģiskās kontakta sensibilizējošās aktivitātes novērtējumā. Tomēr salīdzinājumā ar testēšanas metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas (B.6; ESAO 406. testēšanas metode), tajā iespējams izmantot mazāku skaitu dzīvnieku (14). *LLNA:DA* turklāt piedāvā būtisku uzlabojumu (mazāk sāpju un ciešanu) dzīvnieku izmantojumā alerģiskās kontakta sensibilizējošās testēšanas vajadzībām, jo (atšķirībā no B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijām) *LLNA:DA* nav jānoskaidro provocētās–inducētās ādas hipersensibilizācijas reakcijas. Neraugoties uz *LLNA:DA* priekšrocībām salīdzinājumā ar B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijām (14), šai metodei ir daži ierobežojumi, kuru dēļ tomēr jāizmanto B.6 vai ESAO 406. testēšanas vadlīniju metode (piemēram, dažu metālu testēšanā, šķietami pozitīva rezultāta konstatēšanas gadījumā dažiem ādas sensibilizatoriem [kā, piemēram, atsevišķām surfaktantu tipa vielām] (6) (1; šā pielikuma B.42. nodaļa) vai testējamās vielas šķīdības labad). Turklāt vajadzība pēc jūrascūciņu testiem (B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijas (14)) var saglabāties attiecībā uz ķīmisko vielu klasēm vai vielām, kuru sastāvā ir funkcionālās grupas, par kurām ir pierādīts, ka tās darbojas kā potenciāli sajaucējfaktori (16). Ierobežojumus, kuri konstatēti *LLNA* gadījumā (1; šā pielikuma B.42. nodaļa) ieteicams attiecināt arī uz *LLNA:DA* (10). Turklāt *LLNA:DA* var nebūt piemērotākā metode tādu vielu testēšanai, kas ietekmē ATP koncentrācijas (piemēram, vielas, kam ir ATP inhibējoša iedarbība) vai kas ietekmē starpšūnu ATP mērījumu precizitāti (piemēram, ATP degradējošu enzīmu klātbūtne, ārpusšūnu ATP klātbūtne limfmezglā). Izņemot šādus minētos ierobežojumus, *LLNA:DA* jāvar izmantot jebkuras vielas testēšanai, ja vien testējamai vielai nav tādu īpašību, kas varētu ietekmēt *LLNA:DA* precizitāti. Ja stimulācijas indeksa (SI) vērtība ir robežās no 1,8 līdz 2,5, jāapsver neitrālam tuva pozitīva rezultāta iespējamība (skatīt 31.–32. punktu). Šā apgalvojuma pamatā ir validēšanas datubāze, kuru veido 44 vielas ar SI ≥ 1,8 (skatīt 6. punktu); *LLNA:DA* pareizi identificēja visus 32 *LLNA* sensibilizatorus, bet kļūdaini identificēja trīs no 12 *LLNA* nesensibilizējošajām vielām, kuru SI vērtības bija robežās no 1,8 līdz 2,5 (t. i., pozitīvs neitrālam tuvs rezultāts) (10). Tomēr, tā kā SI vērtību noteikšanai un testēšanas metodes prognozēšanas spējas aprēķināšanai tika izmantota viena un tā pati datu kopa, minētie rezultāti var būt pārāk augsts reālās prognozēšanas spējas novērtējums.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

6. *LLNA:DA* pamatprincips ir tāds, ka sensibilizatori inducē limfocītu savairošanos limfmezglos, kuri drenē testējamās vielas saņemšanas vietu. Šī savairošanās ir proporcionāla devai un alergēna iedarbīgumam un ir vienkāršs paņēmiens, lai iegūtu kvantitatīvu sensitivitātes mērījumu. Savairošanās pakāpi nosaka, vidējo savairošanos katrā testējamās vielas grupā salīdzinot ar vidējo savairošanos kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju (VC). Nosaka attiecību starp vidējo progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju VC grupā; tas ir stimulācijas indekss

▼M3

(SI). Lai testējamo vielu pamatoti turpinātu vērtēt kā potenciālu ādas sensibilizatoru, SI vērtībai jābūt ≥ 1,8. Šeit aprakstītās procedūras pamatā ir adenozīntrifosfāta (ATP) satura mērīšana ar bioluminiscenci (zināms, ka tas korelē ar dzīvo šūnu skaitu) (17), lai indicētu vairojošos šūnu skaita pieaugumu aurikulārajos limfmezglos (18) (19). Biolumuniscences metodē izmanto luciferāzi (enzīms), lai katalizētu gaismas rašanos no ATP un luciferīna šādā reakcijā:

$$ATP + Luciferīns + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oksiluciferīns + AMP + PP_i + CO_2 + Gaisma$$

Emitētās gaismas intensitāte ir lineārā sakarībā ar ATP koncentrāciju, un to mēra ar luminometru. Luciferīna–luciferāzes noteikšana ir jutīga metode ATP kvantitatīvai noteikšanai, kam ir plašs lietojumu spektrs (20).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

7. Šim testam izvēlētā suga ir peles. *LLNA:DA* validēšanas pētījumi ir veikti vienīgi ar CBA/J līnijas dzīvniekiem, un tāpēc to uzskata par ieteicamo līniju (12) (13). Izmanto jaunas, pieaugušas sievišķā dzimuma peles, kas nav dzemdējušas un nav grūsnas. Pētījuma sākumā dzīvniekiem jābūt 8–12 nedēļu veciem, dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un ne lielākām par 20 % no vidējās masas. Citas līnijas un vīrišķā dzimuma dzīvniekus var izmantot, ja ir iegūts pietiekami daudz datu, lai parādītu, ka *LLNA:DA* atbildes reakcijā nav nozīmīgu atšķirību, kas specifiskas līnijai un/vai dzimumam.

Turēšanas un barošanas apstākļi

8. Ja nav zinātniska pamatojuma, kāpēc peles būtu turamas katra atsevišķi, peles izmitina grupā (21). Telpā, kurā tur izmēģinājumu dzīvniekus, jābūt 22 ± 3 °C temperatūrai. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50–60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam atbilstoši secībai 12 stundas gaišas, 12 stundas tumšas. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens daudzumu.

Dzīvnieku sagatavošana

9. Dzīvniekus izvēlas pēc nejaušības principa, marķē individuālai identificēšanai (bet nekādā veidā nemarķē ausis) un tur būros vismaz piecas dienas pirms testa sākuma, lai tos aklimatizētu laboratorijas apstākļos. Pirms apstrādes uzsākšanas visus dzīvniekus apskata, lai pārliecinātos, ka tiem nav novērojami ādas bojājumi.

Testa šķīdumu sagatavošana

10. Cietas ķīmiskās vielas pirms peļu ausu apstrādes izšķīdina vai suspendē, izmantojot šķīdinātājus vai nesējus, un vajadzības gadījumā atšķaida. Šķidras ķīmiskās vielas var izmantot gan atšķaidītas, gan neatšķaidītas. Nešķīstošas ķīmiskās vielas (kādas parasti izmanto medicīnas iekārtās) pirms peļu ausu apstrādes ekstrahē piemērotā šķīdinātājā, lai visas ekstrahējamās sastāvdaļas būtu pieejamas testēšanai. Ja dati par testējamo vielu stabilitāti liecina, ka tās uzglabāt nevar, katru dienu sagatavo svaigas testējamās vielas.

▼M3

Ticamības pārbaude

11. Metodes veiktspējas pienācīgumu parāda ar pozitīvās kontroles vielu (PC) palīdzību, kuras ar adekvātu un reproducējamu sensibilitāti reaģē uz sensibilizējošām testēšanas vielām un kuru reakcijas intensitāte ir sīki aprakstīta. Ieteicams paredzēt vienlaicīgu PC, jo tādā veidā var pierādīt laboratorijas spēju atkārtoti un sekmīgi īstenot noteikšanu, kā arī novērtēt iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību un rezultātu salīdzināmību. Pirms *LLNA:DA* ieteicams lietotājiem konsultēties ar atbildīgajām iestādēm, jo dažas regulatīvās iestādes pieprasa PC izmantošanu katrā individuālā pētījumā. Attiecīgi labāk ir ikreiz izmantot vienlaicīgu PC, jo tas ļauj neveikt papildu testēšanu ar dzīvniekiem, lai izpildītu prasības, kuras var izrietēt no PC neregulāras izmantošanas (skatīt 12. punktu). PC jādod pozitīva *LLNA:DA* atbildes reakcija tādā iedarbības līmenī, kurā ir sagaidāms stimulācijas indekss (SI) ≥ 1,8, salīdzinot ar negatīvās kontroles vielu (NC) grupu. PC deva jāizvēlas tā, lai neizraisītu pārmērīgu ādas kairinājumu vai sistēmisku toksicitāti un lai indukcija būtu atkārtojama, taču ne pārmērīga (piemēram, SI > 10 uzskata par pārmērīgu). Ieteicamākās PC ir 25 % heksilkanēļskābes aldehīds (*Chemical Abstracts Service* [*CAS*] Nr. 101-86-0) un 25 % eigenols (*CAS* Nr. 97-53-0) ar acetonu/olīveļļu (4:1 tilp./tilp.). Var būt apstākļi, kad ar pienācīgu pamatojumu var izmantot citas PC, kas atbilst iepriekš minētajiem kritērijiem.

12. Lai gan vienlaicīgas PC grupas izmantošana ir ieteicama, var būt situācijas, kad laboratorijās, kurās *LLNA:DA* veic regulāri (t. i., vismaz reizi mēnesī) un kurās tāpēc ir vēsturiska PC datubāze, kas pierāda laboratorijas spēju ar PC iegūt reproducējamus un pareizus rezultātus, piemērotāka var izrādīties periodiska PC izmantošana (t. i., vismaz reizi 6 mēnešos). *LLNA:DA* metodes adekvātu pārzināšanu var sekmīgi pierādīt, ar PC iegūstot konsekventus pozitīvus rezultātus vismaz 10 neatkarīgās testēšanas reizēs, kuras veiktas samērīgā laika periodā (t. i., ne ilgāk kā gada laikā).

13. Vienlaicīga PC grupa noteikti jāiekļauj, kad *LLNA:DA* notiek procedurālas izmaiņas (piemēram, augsti kvalificēta personāla nomaiņa, testēšanas metodes materiālu un/vai reaģentu nomaiņa, cits izmēģinājumu dzīvnieku piegādātājs), un šādas izmaiņas pienācīgi jādokumentē laboratorijas pārskatos. Jānovērtē šādu izmaiņu ietekme uz iepriekš izveidotās vēsturiskās datubāzes adekvātumu un tas, vai vajag veidot jaunu vēsturisku datubāzi, lai dokumentētu ar PC iegūtu rezultātu konsekvenci.

14. Pētniekiem jāapzinās, ka lēmums par periodisku, nevis vienlaicīgu PC izmantošanu ietekmēs to, kādā mērā par adekvātiem un pieņemamiem varēs uzskatīt negatīvos pētījumu rezultātus, kas bez vienlaicīgas PC iegūti periodiskās PC izmantošanas starplaikos. Piemēram, ja ar periodisko PC pētījumu iegūst šķietami negatīvu rezultātu, var apšaubīt negatīvu testējamās vielas rezultātu, kas iegūts iepriekšējā pieņemamā periodiskā PC pētījuma un nepieņemamā periodiskā PC pētījuma starplaikā. Tāpēc rūpīgi jāizvērtē, vai izmantot vienlaicīgu vai periodisku PC. Tāpat jāizvērtē, kādas ir iespējas vienlaicīgās PC grupā izmantot mazāk dzīvnieku, ja to var zinātniski pamatot un ja laboratorija ar saviem specifiskajiem vēsturiskajiem datiem var pierādīt, ka ir iespējams izmantot mazāk peļu (22).

▼M3

15. Kaut arī PC jātestē nesējā, par kuru ir zināms, ka tas izrāda viendabīgu atbildes reakciju (piemēram, acetons/olīveļļa; 4:1 tilp./tilp.), var būt dažas reglamentējošas situācijas, kurās būs nepieciešama arī testēšana nestandarta nesējā (klīniski/ķīmiski piederīgs sastāvs) (23). Ja vienlaicīgo PC testē ar citu nesēju nekā testējamo vielu, vienlaicīgās PC vajadzībām jāparedz atsevišķs VC.

16. Ja vērtē vielas, kas pieder konkrētai ķīmisko vielu klasei vai kas dod noteikta diapazona reakciju, var izmantot salīdzināšanas vielas, kuras noder, lai parādītu, ka testēšanas metode darbojas un pienācīgi nosaka šā tipa vielām piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu. Pienācīgām salīdzināšanas vielām ir jāpiemīt šādām īpašībām:

— strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām,

— labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības,

— papildinoši dati no *LLNA:DA*,

— papildinoši dati saistībā ar citiem dzīvniekiem un/vai cilvēku.

TESTA PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un devu līmeņi

17. Uz devas grupu ar vismaz trim testējamās vielas koncentrācijām izmanto vismaz četrus dzīvniekus un vienlaicīgas NC grupu, kas saņem tikai testējamās vielas nesēju, un PC grupu (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu). Jāapsver iespēja testēt vairākas PC devas, īpaši tad, ja PC testēšana ir periodiska. Izņemot apstrādi ar testējamo vielu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

18. Devu un nesēja izvēlei jāpamatojas uz atsaucē (2) un (24) sniegtajiem ieteikumiem. Secīgas devas parasti izraugās no atbilstošas koncentrāciju rindas, kā 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, u. c. Koncentrāciju rindas izvēlei jābūt ar adekvātu zinātnisku pamatojumu. Jāizvērtē visa esošā toksikoloģiskā (piemēram, akūta toksicitāte un dermālais kairinājums) un struktūras un fizikālķīmiskā informācija par attiecīgo testējamo vielu (un/vai par struktūras ziņā saistītām vielām), ja tāda ir, un trīs secīgās koncentrācijas jāizraugās tā, lai augstākā no tām izraisītu stiprāko iedarbību, kura vēl nerada sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (24) (25). Ja šādas informācijas nav, sākumā var būt jāveic priekšskrīninga tests (skatīt 21.–24. punktu).

19. Nesējs nedrīkst pārmainīt vai maskēt testēšanas rezultātus, un tas jāizraugās tāds, lai šķīdība būtu iespējami lielāka, tā ļaujot iegūt augstāko reāli sasniedzamo koncentrāciju un iegūstot šķīdumu/suspensiju, kas būtu derīga testējamās vielas pielietošanai. Ieteicamie nesēji ir acetons/olīveļļa (4:1 tilp./tilp.), *N,N*-dimetilformamīds, metiletilketons, propilēnglikols un dimetilsulfoksīds (6), bet var izmantot arī citus, ja tam ir pietiekams zinātniskais pamatojums. Dažos gadījumos papildu kontrolei jāizmanto klīniski atbilstošs šķīdinātājs vai tirdzniecības preparāts, kura sastāvā testējamo vielu tirgo. Īpaši jārūpējas, lai nodrošinātu to, ka hidrofīlas vielas ir iekļautas nesēja sistēmā, kas mitrina ādu un tūlīt nenotek, un jāizmanto pienācīgi šķīdinātāji (piemēram, 1 % Pluronic® L92). Tādēļ ir jāizvairās no nesējiem, kas satur vienīgi ūdeni.

▼M3

20. Izpētot no individuālām pelēm iegūtus limfmezglus, var novērtēt dzīvnieku savstarpējās atšķirības un iegūt testējamās vielas grupas un VC grupas mērījumu statistisku salīdzinājumu (skatīt 33. punktu). Turklāt PC grupas peļu skaita iespējamā samazinājuma izvērtējumam jēga ir vienīgi tad, ja dati ir par individuāliem dzīvniekiem (22). Dažas regulatīvās iestādes prasa, lai dati būtu par individuāliem dzīvniekiem. Regulāra datu vākšana par individuāliem dzīvniekiem dod priekšrocības dzīvnieku labturības ziņā, jo ļauj izvairīties no atkārtotas testēšanas gadījumā, ja vielas testēšanas rezultātus sākotnēji apkopo vienā veidā (piemēram, par apstrādes grupu), bet regulatīvās iestādes vēlāk izvirza citas prasības (piemēram, pieprasa datus par individuāliem dzīvniekiem).

Priekšskrīninga tests

21. Ja nav informācijas, lai noteiktu augstāko testējamo devu (skatīt 18. punktu), jāveic priekšskrīninga tests, lai definētu ar *LLNA:DA* testējamo atbilstošo devas līmeni. Priekšskrīninga testa mērķis ir būt par orientieri ar *LLNA:DA* testējamā maksimālā devas līmeņa izvēlē, ja nav informācijas par koncentrāciju, kādā testējamā viela izraisa sistēmisku toksicitāti (skatīt 24. punktu) un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (skatīt 23. punktu). Maksimālajam testējamās vielas devas līmenim vajadzētu būt 100 % (šķidrumiem) un augstākajai iespējamajai koncentrācijai (cietām vielām un suspensijām).

22. Priekšskrīninga testa apstākļi ir identiski pamata *LLNA:DA* apstākļiem, izņemot to, ka nevērtē progresiju limfmezglos un ka devas grupā var izmantot mazāku skaitu dzīvnieku. Ieteicamais skaits ir viens vai divi dzīvnieki katrā devas grupā. Visām pelēm ik dienas pārbauda to, vai apstrādes vietā nav klīnisku pazīmju, kas liecinātu par sistēmisku toksicitāti vai lokālu kairinājumu. Pirms testa un tā beigās (8. diena) reģistrē dzīvnieku ķermeņa masu. Katrai peles apskata abas ausis, un iespējamo apsārtumu novērtē pēc 1. tabulas punktu skalas (25). Auss biezumu mēra ar piemērotu mērierīci (piemēram, digitālo mikrometru vai "Peacock" tipa biezuma mērierīci) 1. dienā (pirms devas), 3. dienā (aptuveni 48 stundas pēc pirmās devas), 7. dienā (24 stundas pirms testēšanas beigām) un 8. dienā. Turklāt 8. dienā auss biezumu var mērīt ar auss caursišanas paņēmienu pēc tam, kad dzīvnieki ir humāni nonāvēti. Lokālu kairinājumu uzskata par pārmērīgu tad, ja jebkurā mērījumu dienā apsārtuma novērtējums pēc punktu skalas ir $\geq$ 3 un/vai auss biezums $\geq$ 25 % (26) (27). Lielākā deva, kas izmantojama *LLNA:DA* pamata testā, ir otrā zemākā deva priekšskrīninga koncentrāciju rindā (skatīt 18. punktu), kas neizraisa sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu.

1. tabula

Apsārtuma (eritēmas) skala

Pazīmes	Punktu skaits
Apsārtuma nav	0
Vāji izteikts (gandrīz nemanāms) apsārtums	1
Izteikts apsārtums	2

▼M3

Pazīmes	Punktu skaits
Vidēji stiprs un ļoti stiprs apsārtums	3
Ļoti stiprs apsārtums (biešu sarkans) un kreveles, kas apsārtuma novērtēšanu padara neiespējamu	4

23. Papildus auss biezuma 25 % pieaugumam (26) (27) kairinātāju identificēšanai *LLNA* izmanto arī statistiski nozīmīgus auss biezuma pieauguma rādītājus apstrādātajām pelēm salīdzinājumā ar kontroles grupas pelēm (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tomēr, lai gan statistiski nozīmīgs pieaugums var arī nesasniegt 25 % robežu, šādu pieaugumu neuzskata par pārmērīga kairinājuma izpausmi (30) (31) (32) (33) (34).

24. Turpmāk uzskaitītie klīniskie novērojumi, ja tie ir novērtējuma neatņemama daļa, var liecināt par sistēmisku toksicitāti (35), un tāpēc var parādīt, kāds būs *LLNA:DA* pamata testā izmantojamais maksimālais devas līmenis: nervu sistēmas darbības traucējumi (piemēram, piloarekcija, ataksija, drebuļi un krampji); uzvedības traucējumi (piemēram, agresivitāte, ar personīgo higiēnu saistītās uzvedības maiņa, jūtams aktivitātes samazinājums vai pieaugums); neraksturīga elpošana (piemēram, elpas vilcienu biežuma un intensitātes maiņa, kā apgrūtināta vai spazmatiska elpošana, trokšņi plaušās) un pārmaiņas barības un ūdens uzņemšanā. Turklāt novērtējumā jāņem vērā letarģijas pazīmes un/vai reakcijas samazināšanās un visas klīniskās pazīmes, kas liecina par vairāk nekā mirklīgām sāpēm un ciešanām, vai ķermeņa masas samazinājums par vairāk nekā 5 % laikā no 1. dienas līdz 8. dienai, kā arī mirstības rādītāji. Mirstoši dzīvnieki vai dzīvnieki, kuri uzrāda stipru sāpju un ciešanu pazīmes, ir humāni jānonāvē (36).

Eksperimenta grafiks pamata pētījuma laikā

25. Eksperimenta grafiks ir šāds:

— *1. diena:* individuāli nosaka un reģistrē katra dzīvnieka masu, reģistrē klīniskos novērojumus. Izmantojot SLS šķīdumā iemērktu otiņu un katras auss aizmugures virsmu noklājot četros līdz piecos triepienos, uzliek 1 % nātrija laurilsulfāta (SLS) šķīdumu ūdenī. Stundu pēc apstrādes ar SLS katras auss aizmugures virsmu apstrādā ar 25 µl atšķaidījuma, kurš satur attiecīgo testējamo vielu, tikai nesēju vai PC (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu).

— *2., 3. un 7. diena:* atkārto priekšapstrādi ar 1 % SLS šķīdumu ūdenī un testējamās vielas uzlikšanu kā 1. dienā.

— *4., 5. un 6. diena:* apstrāde nenotiek.

— *8. diena:* reģistrē katra dzīvnieka masu un klīniskos novērojumus. Aptuveni 24 līdz 30 stundas pēc tam, kad 7. dienā sākta vielas uzlikšana, dzīvniekus humāni nonāvē. No katras auss izgriež aurikulāros limfmezglus, kurus katrai pelei atsevišķi apstrādā fizioloģiskajā šķīdumā ar fosfātbuferi (PBS). Sīkus datus un diagrammas par limfmezglu identificēšanu un izgriešanu skatīt atsaucēs (22). Eksperimenta protokolā var iekļaut papildu parametrus, kas raksturo turpmāku ādas lokālo reakciju pamata pētījuma laikā, piemēram, auss apsārtuma novērtējumu pēc punktu skalas vai auss biezuma mērījumus (nosaka ar mērierīci vai ar auss caursišanas paņēmienu autopsijā).

▼M3

Šūnu suspensiju sagatavošana

26. No katrai pelei abās pusēs izgrieztām limfmezglu šūnām (*LNC*) sagatavo atsevišķu šūnu suspensiju; to dara, limfmezglus novietojot starp diviem priekšmetstikliņiem un viegli uzspiežot, lai tie pārplīstu. Kad audi vienmērīgi un plānā kārtā izlīdzinājušies, priekšmetstikliņus atdala vienu no otra. Uz abiem priekšmetstikliņiem esošos audus suspendē ar PBS, priekšmetstikliņu slīpā leņķī turot virs Petri trauciņa un skalojot ar PBS, un vienlaikus ar šūnu skrāpi tīrot priekšmetstikliņu no audiem. Tā kā NC dzīvnieku limfmezgli ir mazi, tie jāapstrādā ar sevišķu rūpību, lai novērstu SI vērtību izkropļojumus. Abu priekšmetstikliņu noskalošanai jāizmanto kopā 1 mL PBS. Petri trauciņā atrodošos *LNC* suspensiju homogenizē, nedaudz apmaisot ar šūnu skrāpi. Ar mikropipeti savāc 20 µL *LNC* suspensijas alikvotas, neskarot ar aci saredzamo membrānu, un pagatavo tās maisījumu ar 1,98 mL PBS, rezultātā iegūstot 2 mL paraugu. Pēc šīs pašas procedūras sagatavo otru 2 mL paraugu; tādā veidā no katra dzīvnieka iegūst divus paraugus.

Šūnu savairošanās noteikšana (limfocītu ATP satura mērīšana)

27. ATP satura pieaugumu limfmezglos mēra ar luciferīna/luciferāzes metodi, izmantojot ATP mērīšanas komplektu, kas mēra bioluminiscenci, to izsakot relatīvās luminiscences vienībās (RLU). Noteikšanas laikam, kas aizrit no dzīvnieka nonāvēšanas brīža līdz ATP satura izmērīšanai, katra individuāla dzīvnieka gadījumā jābūt iespējami vienādākam un jāiekļaujas apmēram 30 minūtēs, jo uzskata, ka ATP saturs pēc dzīvnieka nonāvēšanas pakāpeniski samazinās (12). Tāpēc procedūru virkne, no aurikulāro limfmezglu izgriešanas līdz ATP izmērīšanai, jāpabeidz 20 minūtēs, ievērojot iepriekš noteiktu grafiku, kas visiem dzīvniekiem ir vienāds. ATP luminiscence jāmēra katrā 2 mL paraugā, tādā veidā no katra dzīvnieka iegūstot divus ATP mērījumu rezultātus. Turpmāko aprēķinu vajadzībām nosaka un izmanto vidējo ATP luminiscences rādītāju (skatīt 30. punktu).

NOVĒROJUMI

Klīniskie novērojumi

28. Ikviena pele vismaz reizi dienā ir rūpīgi jānovēro attiecībā uz vietēju kairinājumu apstrādes vietā vai sistēmiskas toksicitātes klīniskajām pazīmēm. Visus novērojumus sistemātiski reģistrē, par katru peli izdarot individuālu ierakstu. Novērošanas plānā jāiekļauj kritēriji, kas ļauj tūlīt identificēt peles, kurām ir sistēmiskas toksicitātes, pārmērīga lokāla ādas kairinājuma vai ādas korozijas pazīmes, lai tām veiktu eitanāziju (36).

Ķermeņa masa

29. Kā norādīts 25. punktā, individuālu dzīvnieku ķermeņa masa ir jānosaka testa sākumā un pirms plānotās humānās nonāvēšanas.

REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

30. Katras apstrādes grupas rezultātu izsaka ar vidējo SI. SI iegūst, vidējo RLU vērtību katrai pelei katrā testējamās vielas grupā un PC grupā dalot ar vidējo RLU vērtību katrai pelei šķīdinātāja/VC grupā. Tā VC grupās vidējais SI ir 1.

▼M3

31. Lēmumu pieņemšanas procesā rezultātu uzskata par pozitīvu, ja SI ≥ 1,8 (10). Tomēr, nosakot, vai neitrālam tuvu rezultātu (t. i., ar SI vērtību robežās no 1,8 līdz 2,5) varētu uzskatīt par pozitīvu, var ņemt vērā arī devas un atbildes reakcijas stiprumu un šķīdinātāja/nesēja un PC reakcijas statistisko nozīmīgumu un konsekvenci (2) (3) (37).

32. Attiecībā uz neitrālam tuvu pozitīvu rezultātu ar SI vērtību robežās no 1,8 līdz 2,5, pirms apstiprināt, ka šis rezultāts ir pozitīvs, lietotāji var izvērtēt tādu papildu informāciju kā devas un atbildes reakcijas mijiedarbība, sistēmiskas toksicitātes vai pārmērīga kairinājuma pazīmes un, attiecīgā gadījumā, statistiskais nozīmīgums apvienojumā ar SI vērtībām (10). Jāņem vērā arī testējamās vielas dažādās īpašības, tostarp tas, vai tā strukturāli līdzinās jau zināmiem ādas sensibilizatoriem, vai tā izraisa pārmērīgu ādas kairinājumu pelēm un kāda veida atbildes reakcija uz devu ir novērota. Šie un citi apsvērumi sīkāk iztirzāti citur (4).

33. Datu vākšana par individuālām pelēm pavērs iespējas statistiskai analīzei par devas un atbildes reakcijas mijiedarbības esību un tās pakāpi šajos datos. Jebkurš statistisks novērtējums var ietvert devas un atbildes reakcijas mijiedarbības novērtējumu, kā arī pienācīgi koriģētus testējamo grupu salīdzinājumus (piemēram, devu pāri grupā un šīs grupas salīdzinājums ar vienlaicīgu šķīdinātāja/kontroles grupu). Statistiskā analīze var ietvert, piemēram, lineāro regresiju jeb Viljamsa [*William's*] testu, ar ko analizē devas un atbildes reakcijas mijiedarbību tendences, un Daneta [*Dunnett*] testu, lai salīdzinātu devu pārus. Izvēloties attiecīgu statistiskās analīzes metodi, pētniekam jāapzinās iespējamās mainīgo lielumu nevienādības un citas ar to saistītās problēmas, kuru dēļ var būt nepieciešama datu pārveidošana vai neparametriskā statistiskā analīze. Visādā ziņā iespējams, ka pētniekam SI būs jāaprēķina un statistiskā analīze jāveic gan ar, gan bez dažiem punktveida datiem (respektīvi, neņemot vērā galējības jeb rupjas kļūdas).

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Dati

34. Dati jāapkopo tabulā, uzrādot indivīdu RLU vērtības, grupas vidējo RLU vērtību uz dzīvnieku, attiecīgo kļūdas apzīmējumu (piem., SD, SEM) un vidējo SI katrai devas grupai salīdzinājumā ar vienlaicīgo šķīdinātāja/kontroles grupu.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai:

Testējamā un kontroles viela:

— identifikācijas dati (piemēram, *CAS* un EK numurs (ja ir); avots; tīrība; zināmie piemaisījumi; partijas numurs),

— fizikālās un fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, gaistamība, stabilitāte, šķīdība),

— maisījuma gadījumā: sastāvs un sastāvdaļu relatīvais procentuālais daudzums.

Šķīdinātājs/nesējs:

— identifikācijas dati (tīrība; koncentrācija (attiecīgā gadījumā); izmantotais tilpums),

— nesēja izvēles pamatojums.

▼M3

Izmēģinājumu dzīvnieki:

— CBA peļu avots,

— dzīvnieku mikrobioloģiskais statuss, ja tas zināms,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— dzīvnieku avots, turēšanas un barošanas apstākļi utt.

Testēšanas apstākļi:

— ATP komplekta avots, partijas numurs un ražotāja kvalitātes nodrošinājuma/kvalitātes kontroles dati,

— sīkas ziņas par testējamās vielas sagatavošanu un pielietošanu,

— devu izvēles pamatojums, attiecīgā gadījumā iekļaujot priekšskrīninga testa rezultātus,

— izmantotās nesēja un testējamās vielas koncentrācijas un pielietotās testējamās vielas kopējais daudzums,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (iekļaujot barības veidu/izcelsmi, ūdens izcelsmi),

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem testa rezultātu klasificē kā pozitīvu vai negatīvu,

— sīkas ziņas par novirzēm no protokola un paskaidrojums par to, kādā veidā šī novirze ietekmē pētījuma plānu un rezultātus.

Ticamības pārbaude:

— jaunākās ticamības pārbaudes rezultātu kopsavilkums, iekļaujot informāciju par testējamo vielu, tās koncentrāciju un nesēju,

— vienlaicīgi un/vai vēsturiski PC un vienlaicīgi negatīvās (šķīdinātājs/nesējs) kontroles dati no testēšanas laboratorijas,

— ja vienlaicīga PC nav paredzēta: datums un laboratorijas pārskats par nesenāko kārtējo PC un pārskats par agrāko PC datiem konkrētajā laboratorijā, kuri pamato vienlaicīgas PC neveikšanu.

Rezultāti:

— individuālu peļu masa dozēšanas sākumā un veicot plānoto nonāvēšanu; vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) katrai apstrādes grupai,

— toksicitātes parādīšanās gaita un pazīmes, iekļaujot ādas kairinājumu ievadīšanas vietā, ja tāds ir, katram dzīvniekam,

— dzīvnieka nonāvēšanas laiks un ATP mērījuma laiks katram dzīvniekam,

— tabula ar individuālu peļu RLU vērtībām un SI vērtībām visām devām katrā apstrādes grupā,

— vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) par RLU katrai pelei katrā apstrādes grupā un galējību jeb rupju kļūdu analīze katrā apstrādes grupā,

▼M3

— aprēķinātais SI un attiecīgs mainības mērs, kas ņem vērā to, ka ne testējamās vielas grupā, ne kontroles grupā dzīvnieki nav identiski,

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— attiecīgā gadījumā, statistiskā analīze.

Rezultātu izvērtējums:

— īss komentārs par rezultātiem, atbildes reakcijas uz devu analīzi un, attiecīgā gadījumā, statistisko analīzi ar secinājumu, vai testējamā viela jāuzskata par ādas sensibilizatoru.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [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. Available at: [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. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pēc testēšanas metodes iegūto mērījumu rezultātu sakritības pakāpe ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās piemērotības aspektiem. Šo terminu bieži izmanto "atbilstības" vietā, ar to apzīmējot pēc testēšanas metodes iegūto pareizo rezultātu daļu (38).

Salīdzināšanas viela: sensibilizējoša vai nesensibilizējoša viela, ko izmanto par standartu salīdzināšanai ar testējamo vielu. Salīdzināšanas vielai ir jābūt: (i) pastāvīgs un uzticams ieguves avots; (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo vielu klases vielām; (iii) zināmas fizikāli ķīmiskās īpašības; (iv) papildu datiem par zināmajiem iedarbības veidiem; (v) vielas zināmajam iedarbības stiprumam jāatbilst vēlamās reakcijas intensitātes diapazonam.

Šķietams negatīvs: viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini noteikta negatīva vai neaktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir pozitīva vai aktīva.

Šķietams pozitīvs: viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini noteikta pozitīva vai aktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir negatīva vai neaktīva.

Bīstamība: potenciālā spēja kaitēt veselībai vai videi. Kaitīgā iedarbība kļūst nosakāma tikai tad, ja iedarbības intensitāte ir pietiekami liela.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (38).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (38).

Galējība jeb rupja kļūda: novērojums, kuru raksturo izteikta novirze no pārējām vērtībām populācijas paraugā, kurš atlasīts pēc nejaušības principa.

Kvalitātes nodrošināšana: pārvaldības process, kurā laboratorijas testēšanas standartu, prasību un pierakstu uzturēšanas procedūru ievērošanu un datu pārneses pareizību novērtē no testēšanas veicējiem neatkarīgas personas.

Ticamība: parametrs, ar kuru mēra pakāpi, kādā tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību (38).

Ādas sensibilizācija: imunoloģisks process, kurš norisinās, ja uz uzņemtspējīgu organismu ārēji iedarbojas stimulējošs ķīmisks alergēns, kas izraisa ādas imūnreakciju, kuras rezultāts var būt kontaktsensibilizācija.

Stimulācijas indekss (SI): vērtība, ko aprēķina, lai novērtētu testējamai vielai piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu; to izsaka kā attiecību starp progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju.

Testējamā viela (arī testējamā ķīmiskā viela): viela vai vielu maisījums, kuru testē ar šo TM.

▼M3

B.51. **ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: LOKĀLO LIMFMEZGLU NOTEIKŠANA (LLNA:BrdU-ELISA)**

IEVADS

1. ESAO ķīmisko vielu testēšanas vadlīnijas un ES testēšanas metodes tiek regulāri pārskatītas, ņemot vērā tehnikas attīstību, regulatīvo prasību izmaiņas un dzīvnieku labturības apsvērumus. Ir pārskatīta B.42 – pirmā no testēšanas metodēm (TM) ādas sensibilizācijas noteikšanai pelēm jeb lokālo limfmezglu noteikšanas metode (*LLNA*; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas) (1; šā pielikuma B.42. nodaļa). Ir publicēti sīki dati par *LLNA* validāciju un pārskats par saistītajiem darbiem (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Lai mērītu limfocītu savairošanos, *LLNA* izmanto radioizotopisko timidīnu vai jodīnu, un tāpēc šīs metodes pielietošana ir ierobežota gadījumos, kad radioaktīvo komponentu iegāde, izmantošana vai apglabāšana ir problemātiska. *LLNA:BrdU-ELISA* [*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, konkurējošā imūnfermentācijas analīze] ir modificēta *LLNA*, kurā nav radioaktīvo komponentu un kurā izmanto ar radioaktīvajiem izotopiem neiezīmētu 5-brom-2-deoksiuridīnu (BrdU) (*Chemical Abstracts Service* [*CAS*] Nr. 59-14-3), lai ar testēšanas sistēmu, kuras pamatā ir *ELISA* metode, mērītu limfocītu savairošanos. *LLNA:BrdU-ELISA* testēšanas metode ir validēta, to ir pārskatījusi starptautiska neatkarīga salīdzinošās zinātniskās izvērtēšanas komisija un ir rekomendējusi šo metodi kā tādu, kas ar dažiem ierobežojumiem uzskatāma par noderīgu ādu sensibilizējošu un nesensibilizējošu ķīmisku vielu identificēšanai (10) (11) (12). Šī TM ir izstrādāta, lai novērtētu ķīmiskām vielām vai to maisījumiem piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu (dzīvniekiem). Šā pielikuma B.6. nodaļā un ESAO 406. testēšanas vadlīnijās aprakstītā metode izmanto testēšanu ar jūrascūciņām, proti, maksimizācijas testu jūrascūciņām un Bīlera testu (13). *LLNA* (šā pielikuma B.42. nodaļa; ESAO 429. testēšanas vadlīnijas) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, *LLNA:BrdU-ELISA* (šā pielikuma B.51. nodaļa; ESAO 442.b testēšanas vadlīnijas) un *LLNA:DA* (šā pielikuma B.50. nodaļa; ESAO 442.a testēšanas vadlīnijas), visas ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām, kas aprakstītas B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijās (13), dzīvnieku skaita samazinājuma un labāka izmantojuma ziņā.

2. Līdzīgi kā *LLNA*, ar *LLNA:BrdU-ELISA* pēta ādas sensibilizācijas indukcijas fāzi un sniedz kvantitatīvus datus, kas piemēroti atbildes reakcijas uz devu novērtēšanai. Turklāt iespēja noteikt ādas sensibilizatorus, neizmantojot radioaktīvus DNS marķierus, atbrīvo no vajadzības risināt arodapstarošanas un radioaktīvo atkritumu apglabāšanas jautājumus. Tas savukārt ļauj ādas sensibilizatoru noteikšanai biežāk izmantot peles un turpināt samazināt jūrascūciņu izmantošanu ādas sensibilizācijas potenciāla testēšanā (t. i., B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13).

DEFINĪCIJAS

3. Definīcijas skatīt 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. *LLNA:BrdU-ELISA* metode ir modificēta *LLNA*, kura paredzēta ķīmisko vielu – potenciālu ādas sensibilizatoru identificēšanai un kurai ir zināmi ierobežojumi. Tas nenozīmē, ka visos gadījumos *LLNA:BrdU-ELISA* būtu jālieto *LLNA* vai jūrascūciņu testa vietā (B.6; ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13), bet gan to, ka šī noteikšana ir minētajam testam līdzvērtīga un to var izmantot kā alternatīvu, kuras pozitīvajam vai negatīvajam rezultātam vairs nav vajadzīgs papildu apstiprinājums (10) (11). Pirms uzsākt pētījumus, testēšanas laboratorijai jāņem vērā visa par testējamo vielu pieejamā

▼M3

informācija. Pie šādas informācijas pieder tās identifikācija un ķīmiskā struktūra, fizikāli ķīmiskās īpašības, citu *in vitro* vai *in vivo* veikto toksicitātes testu rezultāti un toksikoloģiskie dati par struktūras ziņā saistītām vielām. Šī informācija jāizvērtē, lai noteiktu *LLNA:BrdU-ELISA* piemērotību konkrētajai testējamai vielai (ņemot vērā atsevišķu veidu vielu nesaderību ar *LLNA:BrdU-ELISA*; skatīt 5. punktu) un lai izraudzītos pareizu testējamās vielas devu.

5. *LLNA:BrdU-ELISA* ir *in vivo* metode un kā tāda paredz dzīvnieku izmantošanu alerģiskās kontakta sensibilizējošās aktivitātes novērtējumā. Tomēr salīdzinājumā ar testēšanas metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas (B.6; ESAO 406. testēšanas metode), tajā iespējams izmantot mazāku skaitu dzīvnieku (13). *LLNA:BrdU-ELISA* turklāt piedāvā būtisku uzlabojumu dzīvnieku izmantojumā alerģiskās kontakta sensibilizējošās testēšanas vajadzībām, jo (atšķirībā no B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijām) *LLNA:BrdU-ELISA* nav jānoskaidro provocētās–inducētās ādas hipersensibilizācijas reakcijas. Turklāt *LLNA:BrdU-ELISA* nav jāizmanto palīgviela, kā tas ir jūrascūciņu maksimizācijas testā (šā pielikuma B.6. nodaļa; 13). Tādā veidā *LLNA:BrdU-ELISA* samazina dzīvnieku ciešanas. Neraugoties uz *LLNA:BrdU-ELISA* priekšrocībām salīdzinājumā ar B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijām (13), šai metodei ir daži ierobežojumi, kuru dēļ tomēr jāizmanto B.6 vai ESAO 406. testēšanas vadlīniju metode (piemēram, dažu metālu testēšanā, šķietami pozitīva rezultāta konstatēšanas gadījumā dažiem ādas sensibilizatoriem [kā, piemēram, atsevišķām surfaktantu tipa vielām] (6) (1; šā pielikuma B.42. nodaļa) vai testējamās vielas šķīdības labad). Turklāt vajadzība pēc jūrascūciņu testiem (B.6 un ESAO 406. testēšanas vadlīnijas) (13) var saglabāties attiecībā uz ķīmisko vielu klasēm vai vielām, kuru sastāvā ir funkcionālās grupas, par kurām ir pierādīts, ka tās darbojas kā potenciāli sajaucējfaktori (15). Ierobežojumus, kuri konstatēti *LLNA* gadījumā (1; šā pielikuma B.42. nodaļa) ieteicams attiecināt arī uz *LLNA:BrdU-ELISA* (10). Izņemot šādus minētos ierobežojumus, *LLNA:BrdU-ELISA* jāvar izmantot jebkuras ķīmiskas vielas testēšanai, ja vien testējamai ķīmiskajai vielai nav tādu īpašību, kas varētu ietekmēt *LLNA:BrdU-ELISA* precizitāti. Ja stimulācijas indeksa (SI) vērtība ir robežās no 1,6 līdz 1,9, jāapsver neitrālam tuva pozitīva rezultāta iespējamība (skatīt 31.–32. punktu). Šā apgalvojuma pamatā ir validēšanas datubāze, kuru veido 43 vielas ar SI ≥ 1,6 (skatīt 6. punktu); *LLNA:BrdU-ELISA* pareizi identificēja visus 32 *LLNA* sensibilizatorus, bet kļūdaini identificēja divus no 11 *LLNA* nesensibilizējošajām vielām, kuru SI vērtības bija robežās no 1,6 līdz 1,9 (t. i., pozitīvs neitrālam tuvs rezultāts) (10). Tomēr, tā kā SI vērtību noteikšanai un testēšanas metodes prognozēšanas spējas aprēķināšanai tika izmantota viena un tā pati datu kopa, minētie rezultāti var būt pārāk augsts reālās prognozēšanas spējas novērtējums.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

6. *LLNA:BrdU-ELISA* pamatprincips ir tāds, ka sensibilizatori inducē limfocītu savairošanos limfmezglos, kuri drenē testējamās vielas saņemšanas vietu. Šī savairošanās ir proporcionāla devai un alergēna iedarbīgumam un ir vienkāršs paņēmiens, lai iegūtu kvantitatīvu sensitivitātes mērījumu. Savairošanās pakāpi nosaka, vidējo savairošanos katrā testējamās vielas grupā salīdzinot ar vidējo savairošanos kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju (VC). Nosaka attiecību starp vidējo progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju VC grupā; tas ir stimulācijas indekss (SI). Lai testējamo vielu pamatoti turpinātu vērtēt kā potenciālu ādas sensibilizatoru, SI vērtībai jābūt ≥ 1,6. Šeit aprakstīto procedūru pamatā ir BrdU

▼M3

satura noteikšana šūnu savairošanās izmērīšanai aurikulārajos limfmezglos. BrdU ir timidīna analogs un vairojošos šūnu DNS sastāvā iekļaujas līdzīgā veidā. BrdU iekļaušanās pakāpi mēra ar *ELISA* metodi, kurā lieto BrdU specifisku antivielu, kas turklāt iezīmēta ar peroksidāzi. Kad pievieno substrātu, peroksidāze ar to reaģē, un reakcijas produktam ir krāsa; reakcijas produkta daudzumu mēra noteiktā absorbcijas režīmā, izmantojot mikrotitrēšanas plati.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

7. Šim testam izvēlētā suga ir peles. *LLNA:BrdU-ELISA* validēšanas pētījumi ir veikti vienīgi ar CBA/JN līnijas dzīvniekiem, un tāpēc to uzskata par ieteicamo līniju (10) (12). Izmanto jaunas, pieaugušas sievišķā dzimuma peles, kas nav dzemdējušas un nav grūsnas. Pētījuma sākumā dzīvniekiem jābūt 8–12 nedēļu veciem, dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un ne lielākām par 20 % no vidējās masas. Citas līnijas un vīrišķā dzimuma dzīvniekus var izmantot, ja ir iegūts pietiekami daudz datu, lai parādītu, ka *LLNA:BrdU-ELISA* atbildes reakcijā nav nozīmīgu atšķirību, kas specifiskas līnijai un/vai dzimumam.

Turēšanas un barošanas apstākļi

8. Ja nav zinātniska pamatojuma, kāpēc peles būtu turamas katra atsevišķi, peles izmitina grupā (16). Telpā, kurā tur izmēģinājumu dzīvniekus, jābūt 22 ± 3 °C temperatūrai. Lai gan, izņemot telpu uzkopšanas laiku, relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un vēlams ne vairāk kā 70 %, tas jāuztur 50-60 % robežās. Apgaismojumam jābūt mākslīgam atbilstoši secībai 12 stundas gaišas, 12 stundas tumšas. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu dzeramā ūdens daudzumu.

Dzīvnieku sagatavošana

9. Dzīvniekus izvēlas pēc nejaušības principa, marķē individuālai identificēšanai (bet nekādā veidā nemarķē ausis) un tur būros vismaz piecas dienas pirms testa sākuma, lai tos aklimatizētu laboratorijas apstākļos. Pirms apstrādes uzsākšanas visus dzīvniekus apskata, lai pārliecinātos, ka tiem nav novērojami ādas bojājumi.

Testa šķīdumu sagatavošana

10. Cietas ķīmiskās vielas pirms peļu ausu apstrādes izšķīdina vai suspendē, izmantojot šķīdinātājus vai nesējus, un vajadzības gadījumā atšķaida. Šķidras ķīmiskās vielas var izmantot gan atšķaidītas, gan neatšķaidītas. Nešķīstošas ķīmiskās vielas (kādas parasti izmanto medicīnas iekārtās) pirms peļu ausu apstrādes ekstrahē piemērotā šķīdinātājā, lai visas ekstrahējamās sastāvdaļas būtu pieejamas testēšanai. Ja dati par testējamo vielu stabilitāti liecina, ka tās uzglabāt nevar, katru dienu sagatavo svaigas testējamās vielas.

Ticamības pārbaude

11. Metodes veiktspējas pienācīgumu parāda ar pozitīvās kontroles vielu (PC) palīdzību, kas ar adekvātu un reproducējamu sensibilitāti reaģē kā sensibilizējošas testēšanas vielas, kuru reakcijas intensitāte ir sīki aprakstīta. Ieteicams paredzēt vienlaicīgu PC, jo tādā veidā var pierādīt laboratorijas spēju atkārtoti un sekmīgi īstenot noteikšanu, kā arī novērtēt iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību un rezultātu salīdzināmību. Pirms *LLNA:BrdU-ELISA* ieteicams lietotājiem konsultēties ar atbildīgajām iestādēm, jo dažas regulatīvās iestādes pieprasa PC izmantošanu katrā individuālā pētījumā. Attiecīgi labāk ir ikreiz izmantot vienlaicīgu PC, jo tas ļauj neveikt papildu testēšanu ar dzīvniekiem, lai izpildītu prasības, kuras

▼M3

var izrietēt no PC neregulāras izmantošanas (skatīt 12. punktu). PC jādod pozitīva *LLNA:BrdU-ELISA* atbildes reakcija tādā iedarbības līmenī, kurā ir sagaidāms stimulācijas indekss (SI) ≥ 1,6, salīdzinot ar negatīvās kontroles vielu (NC) grupu. PC deva jāizvēlas tā, lai neizraisītu pārmērīgu ādas kairinājumu vai sistēmisku toksicitāti un lai indukcija būtu atkārtojama, taču ne pārmērīga (piemēram, SI > 14 uzskata par pārmērīgu). Ieteicamākās PC ir 25 % heksilkanēļskābes aldehīds (*CAS* Nr. 101-86-0) un 25 % eigenols (*CAS* Nr. 97-53-0) ar acetonu/olīveļļu (4:1 tilp./tilp.). Var būt apstākļi, kad ar pienācīgu pamatojumu var izmantot citas PC, kas atbilst iepriekš minētajiem kritērijiem.

12. Lai gan vienlaicīgas PC grupas izmantošana ir ieteicama, var būt situācijas, kad laboratorijās, kurās *LLNA:BrdU-ELISA* veic regulāri (t. i., vismaz reizi mēnesī) un kurās tāpēc ir vēsturiska PC datubāze, kas pierāda laboratorijas spēju ar PC iegūt reproducējamus un pareizus rezultātus, piemērotāka var izrādīties periodiska PC izmantošana (t. i., vismaz reizi 6 mēnešos). *LLNA:BrdU-ELISA* metodes adekvātu pārzināšanu var sekmīgi pierādīt, ar PC iegūstot konsekventus pozitīvus rezultātus vismaz 10 neatkarīgās testēšanas reizēs, kuras veiktas samērīgā laika periodā (t. i., ne ilgāk kā gada laikā).

13. Vienlaicīga PC grupa noteikti jāiekļauj, kad *LLNA:BrdU-ELISA* notiek procedurālas izmaiņas (piemēram, augsti kvalificēta personāla nomaiņa, testēšanas metodes materiālu un/vai reaģentu nomaiņa, cits izmēģinājumu dzīvnieku piegādātājs), un šādas izmaiņas pienācīgi jādokumentē laboratorijas pārskatos. Jānovērtē šādu izmaiņu ietekme uz iepriekš izveidotās vēsturiskās datubāzes adekvātumu un tas, vai vajag veidot jaunu vēsturisku datubāzi, lai dokumentētu ar PC iegūtu rezultātu konsekvenci.

14. Pētniekiem jāapzinās, ka lēmums par periodisku, nevis vienlaicīgu PC izmantošanu ietekmēs to, kādā mērā par adekvātiem un pieņemamiem varēs uzskatīt negatīvos pētījumu rezultātus, kas bez vienlaicīgas PC iegūti periodiskās PC izmantošanas starplaikos. Piemēram, ja ar periodisko PC pētījumu iegūst šķietami negatīvu rezultātu, var apšaubīt negatīvu testējamās vielas rezultātu, kas iegūts iepriekšējā pieņemamā periodiskā PC pētījuma un nepieņemamā periodiskā PC pētījuma starplaikā. Tāpēc rūpīgi jāizvērtē, vai izmantot vienlaicīgu vai periodisku PC. Tāpat jāizvērtē, kādas ir iespējas vienlaicīgās PC grupā izmantot mazāk dzīvnieku, ja to var zinātniski pamatot un ja laboratorija ar saviem specifiskajiem vēsturiskajiem datiem var pierādīt, ka ir iespējams izmantot mazāk peļu (17).

15. Kaut arī PC jātestē nesējā, par kuru ir zināms, ka tas izrāda viendabīgu atbildes reakciju (piemēram, acetons/olīveļļa; 4:1 tilp./tilp.), var būt dažas reglamentējošas situācijas, kurās būs nepieciešama arī testēšana nestandarta nesējā (klīniski/ķīmiski piederīgs sastāvs) (18). Ja vienlaicīgo PC testē ar citu nesēju nekā testējamo vielu, vienlaicīgās PC vajadzībām jāparedz atsevišķs VC.

▼M3

16. Ja vērtē testējamās vielas, kas pieder konkrētai ķīmisko vielu klasei vai kas dod noteikta diapazona reakciju, var izmantot salīdzināšanas vielas, kuras noder, lai parādītu, ka testēšanas metode darbojas un pienācīgi nosaka šā tipa testējamām vielām piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu. Pienācīgām salīdzināšanas vielām ir jāpiemīt šādām īpašībām:

— strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām,

— labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības,

— papildinoši dati no *LLNA:BrdU-ELISA*,

— papildinoši dati saistībā ar citiem dzīvniekiem un/vai cilvēku.

TESTA PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un devu līmeņi

17. Uz devas grupu ar vismaz trim testējamās vielas koncentrācijām izmanto vismaz četrus dzīvniekus un vienlaicīgas NC grupu, kas saņem tikai testējamās vielas nesēju, un PC grupu (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu). Jāapsver iespēja testēt vairākas PC devas, īpaši tad, ja PC testēšana ir periodiska. Izņemot apstrādi ar testējamo vielu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

18. Devu un nesēja izvēlei jāpamatojas uz atsaucē (2) un (19) sniegtajiem ieteikumiem. Secīgas devas parasti izraugās no atbilstošas koncentrāciju rindas, kā 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, u. c. Koncentrāciju rindas izvēlei jābūt ar adekvātu zinātnisku pamatojumu. Jāizvērtē visa esošā toksikoloģiskā (piemēram, akūta toksicitāte un dermālais kairinājums) un struktūras un fizikālķīmiskā informācija par attiecīgo testējamo vielu (un/vai par struktūras ziņā saistītām vielām), ja tāda ir, un trīs secīgās koncentrācijas jāizraugās tā, lai augstākā no tām izraisītu stiprāko iedarbību, kura vēl nerada sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (19) (20 un šā pielikuma B.4. nodaļa). Ja šādas informācijas nav, sākumā var būt jāveic priekšskrīninga tests (skatīt 21.–24. punktu).

19. Nesējs nedrīkst pārmainīt vai maskēt testēšanas rezultātus, un tas jāizraugās tāds, lai šķīdība būtu iespējami lielāka, tā ļaujot iegūt augstāko reāli sasniedzamo koncentrāciju un iegūstot šķīdumu/suspensiju, kas būtu derīga testējamās vielas pielietošanai. Ieteicamie nesēji ir acetons/olīveļļa (4:1 tilp./tilp.), *N,N*-dimetilformamīds, metiletilketons, propilēnglikols un dimetilsulfoksīds (6), bet var izmantot arī citus, ja tam ir pietiekams zinātniskais pamatojums. Dažos gadījumos papildu kontrolei jāizmanto klīniski atbilstošs šķīdinātājs vai tirdzniecības preparāts, kura sastāvā testējamo vielu tirgo. Īpaši jārūpējas, lai nodrošinātu to, ka hidrofīlas testējamās vielas ir iekļautas nesēja sistēmā, kas mitrina ādu un tūlīt nenotek, un jāizmanto pienācīgi šķīdinātāji (piemēram, 1 % Pluronic® L92). Tādēļ ir jāizvairās no nesējiem, kas satur vienīgi ūdeni.

▼M3

20. Izpētot no individuālām pelēm iegūtus limfmezglus, var novērtēt dzīvnieku savstarpējās atšķirības un iegūt testējamās vielas grupas un VC grupas mērījumu statistisku salīdzinājumu (skatīt 33. punktu). Turklāt PC grupas peļu skaita iespējamā samazinājuma izvērtējumam jēga ir vienīgi tad, ja dati ir par individuāliem dzīvniekiem (17). Dažas regulatīvās iestādes prasa, lai dati būtu par individuāliem dzīvniekiem. Regulāra datu vākšana par individuāliem dzīvniekiem dod priekšrocības dzīvnieku labturības ziņā, jo ļauj izvairīties no atkārtotas testēšanas gadījumā, ja vielas testēšanas rezultātus sākotnēji apkopo vienā veidā (piemēram, par apstrādes grupu), bet regulatīvās iestādes vēlāk izvirza citas prasības (piemēram, pieprasa datus par individuāliem dzīvniekiem).

Priekšskrīninga tests

21. Ja nav informācijas, lai noteiktu augstāko testējamo devu (skatīt 18. punktu), jāveic priekšskrīninga tests, lai definētu ar *LLNA:BrdU-ELISA* testējamo atbilstošo devas līmeni. Priekšskrīninga testa mērķis ir būt par orientieri ar *LLNA:BrdU-ELISA* testējamā maksimālā devas līmeņa izvēlē, ja nav informācijas par koncentrāciju, kādā testējamā viela izraisa sistēmisku toksicitāti (skatīt 24. punktu) un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu (skatīt 23. punktu). Maksimālajai testējamās vielas devas koncentrācijai vajadzētu būt 100 % (šķidrumiem) un augstākajai iespējamajai koncentrācijai (cietām vielām un suspensijām).

22. Priekšskrīninga testa apstākļi ir identiski pamata *LLNA:BrdU-ELISA* apstākļiem, izņemot to, ka nevērtē progresiju limfmezglos un ka devas grupā var izmantot mazāku skaitu dzīvnieku. Ieteicamais skaits ir viens vai divi dzīvnieki katrā devas grupā. Visām pelēm ik dienas pārbauda to, vai apstrādes vietā nav klīnisku pazīmju, kas liecinātu par sistēmisku toksicitāti vai lokālu kairinājumu. Pirms testa un tā beigās (6. diena) reģistrē dzīvnieku ķermeņa masu. Katrai peles apskata abas ausis, un iespējamo apsārtumu novērtē pēc 1. tabulas punktu skalas (20; šā pielikuma B.4. nodaļa). Auss biezumu mēra ar piemērotu mērierīci (piemēram, digitālo mikrometru vai "Peacock" tipa biezuma mērierīci) 1. dienā (pirms devas), 3. dienā (aptuveni 48 stundas pēc pirmās devas) un 6. dienā. Turklāt 6. dienā auss biezumu var mērīt ar auss caursišanas paņēmienu pēc tam, kad dzīvnieki ir humāni nonāvēti. Lokālu kairinājumu uzskata par pārmērīgu tad, ja jebkurā mērījumu dienā apsārtuma novērtējums pēc punktu skalas ir $\geq$ 3 un/vai auss biezums $\geq$ 25 % (21) (22). Lielākā deva, kas izmantojama *LLNA:BrdU-ELISA* pamata testā, ir otrā zemākā deva priekšskrīninga koncentrāciju rindā (skatīt 18. punktu), kas neizraisa sistēmisku toksicitāti un/vai pārmērīgu lokālu ādas kairinājumu.

1. tabula

Apsārtuma (eritēmas) skala

Pazīmes	Punktu skaits
Apsārtuma nav	0
Vāji izteikts (gandrīz nemanāms) apsārtums	1
Izteikts apsārtums	2

▼M3

Pazīmes	Punktu skaits
Vidēji stiprs un ļoti stiprs apsārtums	3
Ļoti stiprs apsārtums (biešu sarkans) un kreveles, kas apsārtuma novērtēšanu padara neiespējamu	4

23. Papildus auss biezuma 25 % pieaugumam (21) (22) kairinātāju identificēšanai *LLNA* izmanto arī statistiski nozīmīgus auss biezuma pieauguma rādītājus apstrādātajām pelēm salīdzinājumā ar kontroles grupas pelēm (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Tomēr, lai gan statistiski nozīmīgs pieaugums var arī nesasniegt 25 % robežu, šādu pieaugumu neuzskata par pārmērīga kairinājuma izpausmi (25) (26) (27) (28) (29).

24. Turpmāk uzskaitītie klīniskie novērojumi, ja tie ir novērtējuma neatņemama daļa, var liecināt par sistēmisku toksicitāti (30), un tāpēc var parādīt, kāds būs *LLNA:BrdU-ELISA* pamata testā izmantojamais maksimālais devas līmenis: nervu sistēmas darbības traucējumi (piemēram, piloarekcija, ataksija, drebuļi un krampji); uzvedības traucējumi (piemēram, agresivitāte, ar personīgo higiēnu saistītās uzvedības maiņa, jūtams aktivitātes samazinājums vai pieaugums); nerakstūrīga elpošana (piemēram, elpas vilcienu biežuma un intensitātes maiņa, kā apgrūtināta vai spazmatiska elpošana, trokšņi plaušās) un pārmaiņas barības un ūdens uzņemšanā. Turklāt novērtējumā jāņem vērā letarģijas pazīmes un/vai reakcijas samazināšanās un visas klīniskās pazīmes, kas liecina par vairāk nekā mirklīgām sāpēm un ciešanām, vai ķermeņa masas samazinājums par vairāk nekā 5 % laikā no 1. dienas līdz 6. dienai, kā arī mirstības rādītāji. Mirstoši dzīvnieki vai dzīvnieki, kuri uzrāda stipru sāpju un ciešanu pazīmes, ir humāni jānonāvē (31).

Eksperimenta grafiks pamata pētījuma laikā

25. Eksperimenta grafiks ir šāds:

— *1. diena:* individuāli nosaka un reģistrē katra dzīvnieka masu, reģistrē klīniskos novērojumus. Katras auss aizmugures virsmu apstrādā ar 25 µl atšķaidījuma, kurš satur attiecīgo testējamo vielu, tikai nesēju vai PC (vienlaicīgu vai nesenu atkarībā no laboratorijas prakses un saistībā ar 11.–15. punktu).

— *2. un 3. diena:* atkārto 1. dienā veikto apstrādi.

— *4. diena:* apstrāde nenotiek.

— *5. diena:* intraperitoneāli injicē 0,5 mL (5 mg uz peli) BrdU (10 mg/mL) šķīduma.

— *6. diena:* reģistrē katra dzīvnieka masu un klīniskos novērojumus. Aptuveni 24 stundas (24 h) pēc BrdU injicēšanas dzīvniekus humāni nonāvē. No katras auss izgriež aurikulāros limfmezglus, kurus katrai pelei atsevišķi apstrādā fizioloģiskajā šķīdumā ar fosfātbuferi (PBS). Sīkus datus un diagrammas par limfmezglu identificēšanu un izgriešanu skatīt atsaucēs (17). Eksperimenta protokolā var iekļaut papildu parametrus, kas raksturo turpmāku ādas lokālo reakciju pamata pētījuma laikā, piemēram, auss apsārtuma novērtējumu pēc punktu skalas vai auss biezuma mērījumus (nosaka ar mērierīci vai ar auss caursišanas paņēmienu autopsijā).

▼M3

Šūnu suspensiju sagatavošana

26. No katrai pelei abās pusēs izgrieztām limfmezglu šūnām (*LNC*) sagatavo atsevišķu šūnu suspensiju, šūnas saudzīgi mehāniski sadalot caur nerūsējošā tērauda sietu ar 200 μm acu izmēru vai izmantojot citu paņēmienu, kas ir derīgs atsevišķu šūnu suspensiju ieguvei (piemēram, vienreizlietojamā plastmasas piestā saberžot limfmezglus un pēc tam tos filtrējot caur #70 neilona filtru). Šajā testā *LNC* suspensijas pareizai sagatavošanai ir izšķiroša nozīme, un tāpēc tās gatavotājam jābūt pieredzējušam un prasmīgam. Tā kā NC dzīvnieku limfmezgli ir mazi, tie jāapstrādā ar sevišķu rūpību, lai novērstu SI vērtību izkropļojumus. Visos gadījumos *LNC* suspensijas mērķtilpums jākoriģē līdz noteiktam optimizētam tilpumam (aptuveni 15 mL). Optimizētā tilpuma vērtību izraugās tā, lai NC grupas vidējās absorbcijas vērtība būtu 0,1–0,2 robežās.

Šūnu savairošanās noteikšana (BrdU satura mērīšana limfocītu DNS)

27. BrdU mēra ar *ELISA* metodi, izmantojot komerciāli pieejamu testēšanas komplektu (piemēram, *Roche Applied Science*, Manheima, Vācija, kataloga nr. 11 647 229 001). Īsumā, 100 μL LNC suspensijas trīskāršā atkārtojumā pārnes plakandibena mikroplates bedrītēs. Pēc *LNC* fiksācijas un denaturācijas katrā bedrītē pievieno anti-BrdU antivielu un ļauj, lai notiek reakcija. Pēc tam mazgājot atdala anti-BrdU antivielu, pievieno substrāta šķīdumu un ļauj, lai rodas hromogēns. Pēc tam mēra absorbciju pie 370 nm, par references viļņa garumu izmantojot 492 nm. Visos gadījumos testēšanas apstākļi jāoptimizē (skatīt 26. punktu).

NOVĒROJUMI

Klīniskie novērojumi

28. Ikviena pele vismaz reizi dienā ir rūpīgi jānovēro attiecībā uz vietēju kairinājumu apstrādes vietā vai sistēmiskas toksicitātes klīniskajām pazīmēm. Visus novērojumus sistemātiski reģistrē, par katru peli izdarot individuālu ierakstu. Novērošanas plānā jāiekļauj kritēriji, kas ļauj tūlīt identificēt peles, kurām ir sistēmiskas toksicitātes, pārmērīga lokāla ādas kairinājuma vai ādas korozijas pazīmes, lai tām veiktu eitanāziju (31).

Ķermeņa masa

29. Kā norādīts 25. punktā, individuālu dzīvnieku ķermeņa masa ir jānosaka testa sākumā un pirms plānotās humānās nonāvēšanas.

REZULTĀTU APRĒĶINĀŠANA

30. Katras apstrādes grupas rezultātu izsaka ar vidējo SI. SI iegūst, vidējo BrdU iezīmēšanas indeksa vērtību katrai pelei katrā testējamās vielas grupā un PC grupā dalot ar vidējo BrdU iezīmēšanas indeksa vērtību šķīdinātāja/VC grupā. Tā VC grupās vidējais SI ir 1.

BrdU iezīmēšanas indeksu definē šādi:

$$\text{BrdU iezīmēšanas indekss} = (ABS_{em} - \text{ABS tukšais}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS tukšais}_{ref})$$

kur: "em" ir emisijas viļņa garums un "ref" ir references viļņa garums.

▼M3

31. Lēmumu pieņemšanas procesā rezultātu uzskata par pozitīvu, ja SI ≥ 1,6 (10). Tomēr, nosakot, vai neitrālam tuvu rezultātu (t. i., ar SI vērtību robežās no 1,6 līdz 1,9) varētu uzskatīt par pozitīvu, var ņemt vērā arī devas un atbildes reakcijas stiprumu un šķīdinātāja/nesēja un PC reakcijas statistisko nozīmīgumu un konsekvenci (3) (6) (32).

32. Attiecībā uz neitrālam tuvu pozitīvu rezultātu ar SI vērtību robežās no 1,6 līdz 1,9, pirms apstiprināt, ka šis rezultāts ir pozitīvs, lietotāji var izvērtēt tādu papildu informāciju kā devas un atbildes reakcijas mijiedarbība, sistēmiskas toksicitātes vai pārmērīga kairinājuma pazīmes un, attiecīgā gadījumā, statistiskais nozīmīgums apvienojumā ar SI vērtībām (10). Jāņem vērā arī testējamās vielas dažādās īpašības, tostarp tas, vai tā strukturāli līdzinās jau zināmiem ādas sensibilizatoriem, vai tā izraisa pārmērīgu ādas kairinājumu pelēm un kāda veida atbildes reakcija uz devu ir novērota. Šie un citi apsvērumi turpmāk iztirzāti sīkāk (4).

33. Datu vākšana par individuālām pelēm pavērs iespējas statistiskai analīzei par devas un atbildes reakcijas mijiedarbības esību un tās pakāpi šajos datos. Jebkurš statistisks novērtējums var ietvert devas un atbildes reakcijas mijiedarbības novērtējumu, kā arī pienācīgi koriģētus testējamo grupu salīdzinājumus (piemēram, devu pāri grupā un šīs grupas salīdzinājums ar vienlaicīgu šķīdinātāja/kontroles grupu). Statistiskā analīze var ietvert, piemēram, lineāro regresiju jeb Viljamsa [*William's*] testu, ar ko analizē devas un atbildes reakcijas mijiedarbību tendences, un Daneta [*Dunnett*] testu, lai salīdzinātu devu pārus. Izvēloties attiecīgu statistiskās analīzes metodi, pētniekam jāapzinās iespējamās mainīgo lielumu nevienādības un citas ar to saistītās problēmas, kuru dēļ var būt nepieciešama datu pārveidošana vai neparametriskā statistiskā analīze. Visādā ziņā iespējams, ka pētniekam SI būs jāaprēķina un statistiskā analīze jāveic gan ar, gan bez dažiem punktveida datiem (respektīvi, neņemot vērā galējības jeb rupjas kļūdas).

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Dati

34. Dati jāapkopo tabulā, uzrādot indivīdu BrdU iezīmēšanas indeksa vērtības, grupas vidējo BrdU iezīmēšanas indeksa vērtību uz dzīvnieku, attiecīgo kļūdas apzīmējumu (piem., SD, SEM) un vidējo SI katrai devas grupai salīdzinājumā ar vienlaicīgo šķīdinātāja/kontroles grupu.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai:

Testējamā un kontroles viela:

— identifikācijas dati (piemēram, *CAS* un EK numurs (ja ir); avots; tīrība; zināmie piemaisījumi; partijas numurs),

— fizikālās un fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, gaistamība, stabilitāte, šķīdība),

— maisījuma gadījumā: sastāvs un sastāvdaļu relatīvais procentuālais daudzums.

Šķīdinātājs/nesējs:

— identifikācijas dati (tīrība; koncentrācija (attiecīgā gadījumā); izmantotais tilpums),

— nesēja izvēles pamatojums.

▼M3

Izmēģinājumu dzīvnieki:

— CBA peļu avots,

— dzīvnieku mikrobioloģiskais statuss, ja tas zināms,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— dzīvnieku avots, turēšanas un barošanas apstākļi utt.

Testēšanas apstākļi:

— *ELISA* komplekta avots, partijas numurs un ražotāja kvalitātes nodrošinājuma/kvalitātes kontroles dati (jutība pret antivielām, specifiskums un detekcijas limits),

— sīkas ziņas par testējamās vielas sagatavošanu un pielietošanu,

— devu izvēles pamatojums, attiecīgā gadījumā iekļaujot priekšskrīninga testa rezultātus,

— izmantotās nesēja un testējamās vielas koncentrācijas un pielietotās testējamās vielas kopējais daudzums,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (iekļaujot barības veidu/izcelsmi, ūdens izcelsmi),

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem testa rezultātu klasificē kā pozitīvu vai negatīvu,

— sīkas ziņas par novirzēm no protokola un paskaidrojums par to, kādā veidā šī novirze ietekmē pētījuma plānu un rezultātus.

Ticamības pārbaude:

— jaunākās ticamības pārbaudes rezultātu kopsavilkums, iekļaujot informāciju par testējamo vielu, tās koncentrāciju un nesēju,

— vienlaicīgi un/vai vēsturiski PC un vienlaicīgi negatīvās (šķīdinātājs/nesējs) kontroles dati no testēšanas laboratorijas,

— ja vienlaicīga PC nav paredzēta: datums un laboratorijas pārskats par nesenāko kārtējo PC un pārskats par agrāko PC datiem konkrētajā laboratorijā, kuri pamato vienlaicīgas PC neveikšanu.

Rezultāti:

— individuālu peļu masa dozēšanas sākumā un veicot plānoto humāno nonāvēšanu; vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) katrai apstrādes grupai,

— toksicitātes parādīšanās gaita un pazīmes, iekļaujot ādas kairinājumu ievadīšanas vietā, ja tāds ir, katram dzīvniekam,

— tabula ar individuālu peļu BrdU iezīmēšanas indeksa un SI vērtībām katrā apstrādes grupā,

— vidējās vērtības un attiecīgais kļūdas apzīmējums (piem., SD, SEM) par BrdU iezīmēšanas indeksu katrai pelei katrā apstrādes grupā un galējību jeb rupju kļūdu analīze katrā apstrādes grupā,

▼M3

— aprēķinātais SI un attiecīgs mainības mērs, kas ņem vērā to, ka ne testējamās vielas grupā, ne kontroles grupā dzīvnieki nav identiski,

— devas un atbildes reakcijas sakarības,

— attiecīgā gadījumā, statistiskā analīze.

Rezultātu izvērtējums:

— īss komentārs par rezultātiem, atbildes reakcijas uz devu analīzi un, attiecīgā gadījumā, statistisko analīzi ar secinājumu, vai testējamā viela jāuzskata par ādas sensibilizatoru.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [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. Available at: [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. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pēc testēšanas metodes iegūto mērījumu rezultātu sakritības pakāpe ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās piemērotības aspektiem. Šo terminu bieži izmanto "atbilstības" vietā, ar to apzīmējot pēc testēšanas metodes iegūto pareizo rezultātu daļu (33).

Salīdzināšanas viela: sensibilizējoša vai nesensibilizējoša viela, ko izmanto par standartu salīdzināšanai ar testējamo vielu. Salīdzināšanas vielai ir jāpiemīt šādām īpašībām: (i) pastāvīgs un uzticams ieguves avots, (ii) struktūras un funkciju līdzība ar testējamo vielu klases vielām, (iii) zināmas fizikālās/ķīmiskās īpašības; (iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem; (v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās reakcijas intensitātes diapazonam.

Šķietams negatīvs: testējamā viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini noteikta negatīva vai neaktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir pozitīva vai aktīva (33).

Šķietams pozitīvs: testējamā viela, kurai ar testēšanas metodi kļūdaini noteikta pozitīva vai aktīva reakcija, lai gan faktiski tā ir negatīva vai neaktīva (33).

Bīstamība: potenciālā spēja kaitēt veselībai vai videi. Kaitīgā iedarbība kļūst nosakāma tikai tad, ja iedarbības intensitāte ir pietiekami liela.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (33).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (33).

Galējība jeb rupja kļūda: novērojums, kuru raksturo izteikta novirze no pārējām vērtībām populācijas paraugā, kurš atlasīts pēc nejaušības principa.

Kvalitātes nodrošināšana: pārvaldības process, kurā laboratorijas testēšanas standartu, prasību un pierakstu uzturēšanas procedūru ievērošanu un datu pārneses pareizību novērtē no testēšanas veicējiem neatkarīgas personas.

Ticamība: parametrs, ar kuru mēra pakāpi, kādā tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorijas un starplaboratoriju reproducējamību (33).

Ādas sensibilizācija: imunoloģisks process, kurš norisinās, ja uz uzņemtspējīgu organismu ārēji iedarbojas stimulējošs ķīmisks alergēns, kas izraisa ādas imūnreakciju, kuras rezultāts var būt kontaktsensibilizācija.

Stimulācijas indekss (SI): vērtība, ko aprēķina, lai novērtētu testējamai vielai piemītošo ādas sensibilizācijas potenciālu; to izsaka kā attiecību starp progresiju grupās, kas saņēmušas pētāmo vielu, un progresiju kontroles grupā, kas saņēmusi tikai nesēju.

Testējamā viela (arī testējamā ķīmiskā viela): viela vai vielu maisījums, kuru testē ar šo TM.

▼M4

B.52. **AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: AKŪTĀS TOKSICITĀTES KLASES METODE**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 436 (*TG*) (2009. gads). Pirmos *TG 403* par akūto inhalācijas toksicitāti pieņēma 1981. gadā. Kopš tā laika tie ir pārskatīti (sk. šā pielikuma B.2. nodaļu (1)). Inhalācijas akūtās toksicitātes klases (*ATC*) metodes (2) (3) (4) izstrādi uzskatīja par nepieciešamu pēc tam, kad tika pieņemta pārskatītā orālās *ATC* metode (šā pielikuma B.1.c nodaļa) (5). Retrospektīvi pēc veiktspējas novērtējot šo metodi, tika atzīts, ka šī metode ir piemērota izmantošanai klasificēšanas un marķēšanas nolūkos (6). Inhalācijas *ATC* testēšanas metode dos iespēju ranžēt testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, izmatojot vairākas pakāpeniski pieaugošas mērķkoncentrācijas. Mirstību izmanto par svarīgāko beigupunktu, tomēr dzīvnieki, kas cieš smagas sāpes vai mokas vai kas acīmredzami nobeigsies, ir humāni jānonāvē, lai mazinātu ciešanas. Norādījumi par humāniem beigupunktiem pieejami ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 19 (7).

2. Norādījumi par šīs testēšanas metodes īstenošanu un interpretēšanu ir pieejami *Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing* (*GD 39*) (8).

3. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā un *GD* 39 (8).

4. Šī testēšanas metode sniedz informāciju par testējamās ķīmiskās vielas bīstamajām īpašībām un ļauj šo vielu ranžēt un klasificēt saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008 attiecībā uz ķīmisko vielu, kuras rada akūtu toksicitāti, klasifikāciju (9). Ja ir vajadzīgas LC_{50} vērtību punktu aplēses vai koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarības analīze, jāizmanto šā pielikuma B.2. nodaļas testēšanas metode (1). Papildu norādījumi par testēšanas metodes izvēli ir pieejami *GD 39* (8). Šī testēšanas metode nav paredzēta tieši specializētu materiālu, piemēram, mazšķīstošu izometrisku materiālu vai šķiedrmateriālu, vai rūpnieciski ražotu nanomateriālu, testēšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu testos, testēšanas laboratorijai, pirms tā apsver, vai testēšanu neveikt saskaņā ar šo metodi, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu, arī līdzšinējie pētījumi, kuru dati palīdzētu izvairīties no papildu testēšanas. Informācija, kas varētu palīdzēt piemērotāko sugu, līniju, dzimuma, ekspozīcijas režīma un attiecīgu testējamo koncentrāciju noteikšanā, ietver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzēto(-os) izmantojumu(-us) un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos *(Q)SAR* datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām. Ar šo testēšanas metodi nedrīkstētu testēt koncentrācijas, kuru kodīgā ([1]) vai stipri kairinošā iedarbība var radīt stipras sāpes un/vai ciešanas (sk. *GD 39* (8)).

([1]) Kodīguma novērtējuma pamatā varētu būt ekspertu atzinums, kurā izmantotas tādas liecības kā cilvēku un dzīvnieku pieredze, pieejamie (*in vitro*) dati, piemēram, šā pielikuma B.40. nodaļa (10) un B.40.a nodaļa (11) vai ESAO *TG 435* (12), pH vērtības, informācija par citām, līdzīgām ķīmiskajām vielām vai jebkādi citi būtiski dati.

▼M4

TESTA PRINCIPS

6. Testa princips ir tāds, ka četras stundas ilgā ekspozīcijā vairākpakāpju procedūrā iegūst testējamās ķīmiskās vielas klasificēšanai pietiekamu informāciju par šīs vielas akūto inhalācijas toksicitāti. Konkrētām regulatīvām vajadzībām var izmantot citus ekspozīcijas ilgumus. Katrai noteiktajai koncentrācijas pakāpei izmanto trīs katra dzimuma dzīvniekus. Atkarībā no dzīvnieku mirstības (nāve un/vai pirmsnāves stāvoklis) testējamās ķīmiskās vielas akūtās toksicitātes noteikšanai var pietikt ar divām pakāpēm. Ja ir pieejamas liecības, ka kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks, testu var turpināt tikai ar uzņēmīgāko dzimumu. Iepriekšējās pakāpes rezultāts noteiks nākamo pakāpi, proti:

a) vai nu turpmāki testi nav vajadzīgi;

b) vai jāveic tests ar trijiem katra dzimuma dzīvniekiem; vai

c) jāveic tests ar sešiem uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekiem, t. i., toksicitātes klases zemākās robežas aplēšu pamatā jābūt sešiem dzīvniekiem katrā testa koncentrācijas grupā neatkarīgi no dzimuma.

7. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīmredzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testa rezultātus, tie jāuzlūko tāpat kā testā nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (7).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

8. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja izmanto citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

9. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ekspozīcijas dienā dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem (8–12 nedēļas) veciem dzīvniekiem ar ķermeņa svaru, kas nepārsniedz ± 20 % no jebkādu iedarbībai iepriekš pakļautu tāda paša vecuma abu dzimumu dzīvnieku vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas pēc nejaušības principa un marķē individuālai identificēšanai. Dzīvniekus līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos. Dzīvnieki uz īsu laiku pirms testa sākšanas ir jāaklimatizē arī attiecībā uz testa aprīkojumu, jo tas mazinās jaunās vides radīto stresu.

Dzīvnieku turēšana

10. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir

▼M4

pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

Inhalācijas kameras

11. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības un testa mērķis. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmienu principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti *GD 39* (8).

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

12. Ekspozīcijai ieteicams izvēlēties nemainīgu četru stundu ilgumu, izņemot līdzsvara sasniegšanas laiku. Var būt vajadzīgi citi ilgumi, lai nodrošinātu atbilstību konkrētām prasībām, tomēr pētījuma ziņojumā tas jāpamato (sk. *GD* 39 (8)). Dzīvnieki, kas iedarbībai tiek pakļauti visa ķermeņa kamerās, ir jātur atsevišķi, lai nepieļautu, ka testējamā ķīmiskā viela tiek uzņemta, laizot citus būra dzīvniekus. Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.

13. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas.

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

14. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (*MMAD*) diapazonā no 1 līdz 4 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (8) (13) (14). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas, šķiedrmateriāli un higroskopiski materiāli (kas elpošanas sistēmas mitrajā vidē izplešas) šo standartu var pārsniegt.

▼M4

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

15. Lai ģenerētu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu atmosfērā, var izmantot nesējvielu. Ieteicamā nesējviela visos gadījumos noteikti ir ūdens. Lai panāktu vajadzīgo daļiņu sadalījumu pēc lieluma, daļiņu materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem, tomēr jānodrošina, lai testējamā ķīmiskā viela nesadalītos un nepārmainītos. Gadījumos, kad uzskata, ka mehāniski procesi ir mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu (piemēram, pārāk augstās temperatūrās, ko pārāk intensīvā malšanā radījusi berze), testējamās ķīmiskās vielas sastāvs ir analītiski jāpārbauda. Jāievēro vajadzīgā piesardzība, lai testējamo ķīmisko vielu nepiesārņotu. Nav nepieciešams testēt nedrūpošus graudveida materiālus, kas ir izstrādāti tā, lai būtu neieelpojami. Jāveic berzes tests, lai pierādītu, ka, apstrādājot graudveida materiālus, nerodas ieelpojamas daļiņas. Ja berzes testā tiek iegūtas ieelpojamas daļiņas, jāveic inhalācijas toksicitātes tests.

Kontroldzīvnieki

16. Līdztekus veiktas negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav vajadzīga. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto nesējvielu, kas nav ūdens, nesējvielas kontrolgrupa jāizmanto tikai tad, ja nav pieejami vēsturiski inhalācijas toksicitātes dati. Ja nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes pētījums toksicitāti neatklāj, secina, ka nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska; tādējādi nesējvielas kontroles grupa nav nepieciešama.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS

Gaisa plūsma caur kameru

17. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai stabilitātes) monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos atmosfēras ģenerēšanas parametrus. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana gadījumos, kur gaisa plūsma ekspozīcijas sistēmā nav pietiekama, lai nodrošinātu testējamās ķīmiskās vielas atmosfēras dinamisku plūsmu. Ir pieejamas metodikas, ko var izmantot, lai pierādītu, ka konkrētos darbības apstākļos atkārtota ieelpošana nenotiek (8) (15). Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šiem standartiem, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

18. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir jāmonitorē un jāreģistrē vismaz trīs reizes, ja tests ilgst līdz četrām stundām, un reizi stundā, ja tas ir īsāks. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

▼M4

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

19. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko dala ar kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

20. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija inhalācijas kameras dzīvnieku inhalācijas zonā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jāpamato ar attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka ar izraudzīto metodi ievāktas visas fāzes. Mērķa, nominālās un faktiskas koncentrācijas ir jānorāda pētījuma ziņojumā, bet statistiskajā analīzē, kurā aprēķina letālo koncentrāciju vērtības, izmanto vienīgi faktiskās koncentrācijas.

21. Ja iespējams, jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)

22. Ekspozīcijas atmosfēru uztur iespējami nemainīgu un nepārtraukti un/vai periodiski monitorē atkarībā no analīzes metodes. Ja paraugus ņem periodiski, četru stundu pētījuma laikā kameras atmosfēras paraugi ir jāņem vismaz divas reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, visā ekspozīcijas periodā var paņemt vienu paraugu. Ja tiek konstatētas ievērojamas svārstības starp paraugiem, nākamo koncentrāciju testēšanā katras ekspozīcijas laikā jāņem četri paraugi. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem un ± 20 % šķidriem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas laiks ilgst visu testējamās ķīmiskās vielas ģenerēšanas laiku, ieskaitot laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu t_{95}. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti *GD 39* (8).

▼M4

23. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no tvaikiem/gāzēm, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no galīgajam izmantojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi, tāpēc katrai fāzei (tvaiki/gāze un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai komponentam (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama *GD 39* (8).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

24. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz divas reizes katras četru stundu ekspozīcijas laikā, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju. Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsitējs / gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. *GD 39* (8)). Ja pētījuma agrīnā posmā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecinošu datu ieguvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot ekspozīciju. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību (sk. 14. punktu).

PROCEDŪRA

Galvenais tests

25. Katrā posmā izmanto trīs katra dzimuma dzīvniekus vai sešus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Sākuma devai izmantojamo koncentrācijas līmeni izvēlas no četriem noteiktajiem līmeņiem, un sākumkoncentrācijas līmenim jābūt tādam, kas, visticamāk, izraisīs toksicitāti dažiem no devu saņēmušajiem dzīvniekiem. Testēšanas shēmas gāzēm, tvaikiem un aerosoliem (ietvertas 2.–4. papildinājumā) paredz testēšanu ar *CLP* 1.–4. kategorijas robežvērtībām (9) gāzēm (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (2. papildinājums), tvaikiem (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (3. papildinājums) un aerosoliem (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (4. papildinājums). Savukārt 5. kategorija, kas Regulā (EK) Nr. 1272/2008 nav ietverta (9), attiecas uz koncentrācijām, kuras pārsniedz attiecīgās robežkoncentrācijas. Katrai sākumkoncentrācijai piemēro attiecīgo testēšanas shēmu. Atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita testēšanas procedūra seko norādītajām bultām, līdz var noteikt kategoriju.

26. Laika intervāls starp ekspozīcijas grupām ir atkarīgs no toksicitātes pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvnieki jāpakļauj tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdzīvojušajiem dzīvniekiem. Lai novērotu aizkavētu toksicitāti, ieteicams ievērot 3–4 dienu starplaiku starp ekspozīcijām ar katru koncentrācijas līmeni. Starplaiku var koriģēt pēc vajadzības, piemēram, gadījumos, kad atbildes reakcijas nav pārliecinošas.

▼M4

Pieļaujamā daudzuma tests

27. Pieļaujamā daudzuma testu izmanto gadījumos, kad par testējamo ķīmisko vielu ir zināms vai sagaidāms, ka tā faktiski būs netoksiska, t. i., tā izraisīs toksisku atbildes reakciju tikai tad, ja koncentrācija pārsniegs regulatīvo robežkoncentrāciju. Informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu var iegūt no zināšanām par citām līdzīgām pārbaudītām vielām vai citiem līdzīgiem maisījumiem, ņemot vērā to sastāvdaļu identitāti un procentuālo īpatsvaru, par kurām ir zināms, ka tām piemīt būtisks toksiskums. Situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī ir paredzams, ka testējamā ķīmiskā viela būs toksiska, ir jāveic galvenais tests (papildu norādījumi pieejami *GD 39* (8)).

28. Saskaņā ar parasto procedūru trīs katra dzimuma dzīvniekus vai sešus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus pakļauj šādu koncentrāciju iedarbībai: 20 000 ppm gāzēm, 20 mg/l tvaikiem un 5 mg/l putekļiem/miglai (ja tās var sasniegt), kas būtu šīs testēšanas metodes pieļaujamā daudzuma tests. Testējot aerosolus, galvenajam mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (t. i., 1–4 μm *MMAD*). Ar lielāko daļu testējamo ķīmisko vielu tas ir iespējams koncentrācijā 2 mg/l. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. *GD 39* (8)). Saskaņā ar *GHS* (16) dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ir ieteicams izvairīties no testiem ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas. Vai neveikt testus ar *GHS* 5. kategoriju (16), kas nav paredzēta Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9), ir jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šādu testu rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībā, un tādā gadījumā pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmantotu dzīvniekus, pirms pieļaujamā daudzuma testa ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka pieļaujamā daudzuma testa kameras apstākļi ir sasniedzami.

NOVĒROJUMI

29. Ekspozīcijas perioda laikā dzīvnieki ir regulāri klīniski jānovēro. Pēc ekspozīcijas klīniskie novērojumi ekspozīcijas dienā jāveic vismaz divreiz vai biežāk, ja to indicē dzīvnieku reakcija uz vielas saņemšanu, un vismaz reizi dienā nākamās 14 dienas. Novērošanas perioda ilgums nav noteikts, bet tas ir jānosaka atkarībā no klīnisko pazīmju veida un iestāšanās laika, kā arī no atveseļošanās perioda ilguma. Ir svarīgi, kādos laikos parādās un izzūd toksicitātes pazīmes, it sevišķi, ja tām ir tendence aizkavēties. Visus novērojumus regulāri reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kam vērojamas lielu sāpju un/vai ilgstošu ciešanu pazīmes, dzīvnieku labturības nolūkos ir humāni jānonāvē. Veicot pārbaudes, lai pamanītu klīniskas toksicitātes pazīmes, ir jāuzmanās, lai sākotnējs savārgums un tādas pārejošas pārmaiņas elpošanā, ko izraisījusi ekspozīcijas procedūra, netiktu kļūdaini uzskatītas par vielas ievadīšanas ietekmi. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Humane Endpoints Guidance Document* (7). Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

▼M4

30. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites, veģetatīvās un centrālās nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Ja iespējams, uzmanība jāpievērš jebkādām atšķirībām starp lokālo un sistēmisko ietekmi. Uzmanība jāpievērš novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu.

Ķermeņa svars

31. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē vienu reizi aklimatizēšanās periodā, ekspozīcijas dienā pirms ekspozīcijas (0. diena) un vismaz pirmajā, trešajā un septītajā dienā (un reizi nedēļā pēc tam), kā arī nāves vai eitanāzijas brīdī, ja tas notiek pēc pirmās dienas. Ķermeņa svaru uzskata par ļoti svarīgu toksicitātes pazīmi, tādēļ dzīvnieki, kam vērojams noturīgs ≥ 20 % dekrements salīdzinājumā ar vērtībām, kuras iegūtas priekšizpētē, ir cieši jāmonitorē. Izdzīvojušos dzīvniekus nosver un humāni nonāvē pēcekspozīcijas perioda beigās.

Patoloģija

32. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kam dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izdarīta eitanāzija un kas izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna autopsija. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsija jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādām pārmaiņām elpošanas sistēmā.

33. Lai paplašinātu pētījuma interpretējošo vērtību, var apsvērt, vai apriori neparedzēt papildu pārbaudes, piemēram, izdzīvojušo žurku plaušu svara noteikšanu un/vai tādas liecības par kairinājumu, ko gūst elpošanas sistēmas mikroskopiskā izmeklēšanā. Tāpat var izmeklēt tādus orgānus, kas liecina par smagām patoloģiskām pārmaiņām dzīvniekos, kuri izdzīvojuši 24 vai vairāk stundas, un orgānus, par ko ir zināms vai gaidāms, ka tie tiks skarti. Visas elpošanas sistēmas mikroskopiska izmeklēšana var nodrošināt lietderīgu informāciju par testējamajām ķīmiskajām vielām, kas reaģē ar ūdeni, piemēram, skābēm un higroskopiskām testējamām ķīmiskām vielām.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

34. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka svaru un autopsijas atradi. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kas izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi.

▼M4

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

— apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,

— izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— nejaušināšanas metode,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),

— jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),

— identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (*CAS*), ja zināms.

Nesējviela:

— nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),

— vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

— inhalācijas kameras apraksts, ieskaitot izmērus un tilpumu,

— dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,

— temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,

— gaisa avots, pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde un izmantotā kondicionēšanas sistēma,

— metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,

— spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),

— ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta sistēmā (visa ķermeņa ekspozīcija),

— testa atmosfēras īslaicīga homogenitāte/stabilitāte,

— temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,

— gaisa caurplūduma rādītāji: gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniekslodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),

— attiecīgā gadījumā informācija par skābekļa un oglekļa dioksīda mērīšanai izmantoto aprīkojumu,

▼M4

— laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),

— tilpuma nomaiņu skaits stundā,

— mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

— pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,

— nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),

— testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Testējamiem maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,

— visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (piemēram, mg/l, mg/m^3 utt.) Iekavās var uzrādīt arī tilpuma vienības (piemēram, ppm, ppb),

— daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (*MMAD*) un ģeometriskā standartnovirze (σ_g), tostarp to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķu daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu vielu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai. Gadījumos, kad mehāniski procesi ir, iespējams, mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu, ziņojumā jāietver tādu analīžu rezultāti, kurās verificēts testējamās ķīmiskās vielas sastāvs,

— apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un dzīvniekus pakļauj tās iedarbībai,

— sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),

— testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

— tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,

— tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,

— tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un *MMAD* un σ_g aprēķinus,

— tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums un ilgums),

— pētījuma dienās ievāktā informācija par katra dzīvnieka svaru, nāves datums un laiks, ja nāve iestājusies pirms paredzētās eitanāzijas, toksicitātes pazīmju parādīšanās gaita un par katru dzīvnieku norāde, vai šīs pazīmes bijušas atgriezeniskas,

▼M4

— katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,

— *CLP* kategorijas klasifikācija un LC_{50} robežvērtība.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

— īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,

— ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,

— pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,

— jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks attiecībā pret vietēju),

— jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (7) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma B.2. nodaļa "Akūtā inhalācijas toksicitāte".

(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) Šā pielikuma B.1.b nodaļa "Akūts perorāls toksiskums – akūta toksiskuma klases metode".

(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. Pieejams: 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. Pieejams: 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. Pieejams: http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼**M4**

(10) Šā pielikuma B.40. nodaļa "*In vitro* ādas erozija: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".

(11) Šā pielikuma B.40.a nodaļa "Ādas erozijas *in vitro* tests: cilvēka ādas modeļa tests".

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Pieejams: 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. Pieejams: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html.

▼**M4**

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼**M4**

2. papildinājums

Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra gāzēm (ppm/4 h)

Vispārīgas piezīmes ([1])

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

2.a papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 100 ppm.

2.b papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 500 ppm.

2.c papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 2 500 ppm.

2.d papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 20 000 ppm.

Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

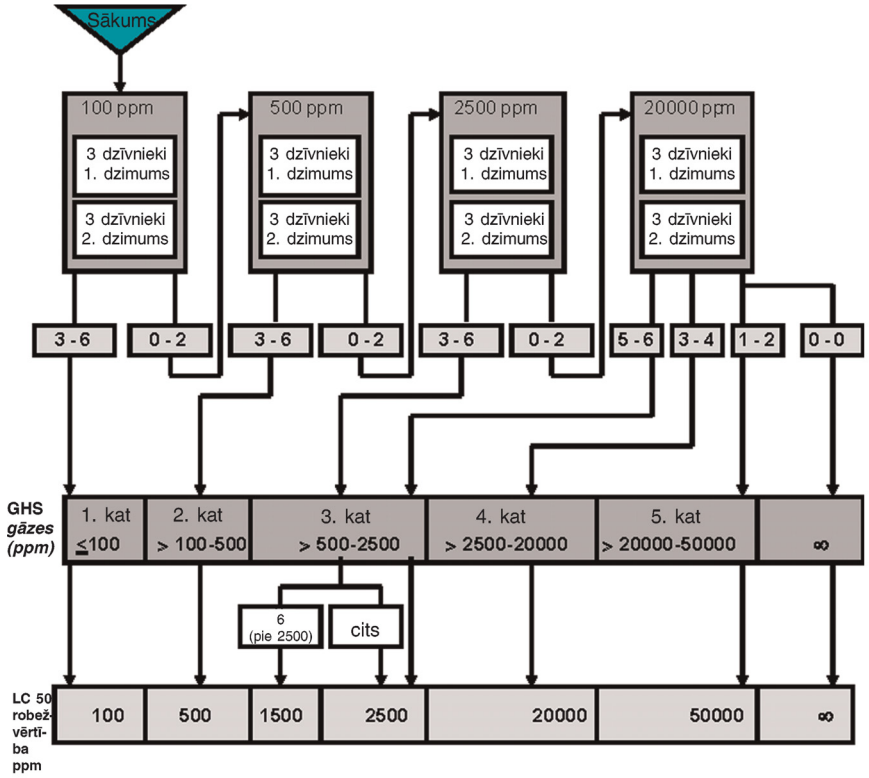
([1]) Turpmāk norādītajās tabulās ir atsauces uz Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (GHS). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

▼**M4**

2.a papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

testēšanas procedūra ar sākum koncentrāciju 100 ppm / 4 h gāzēm



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

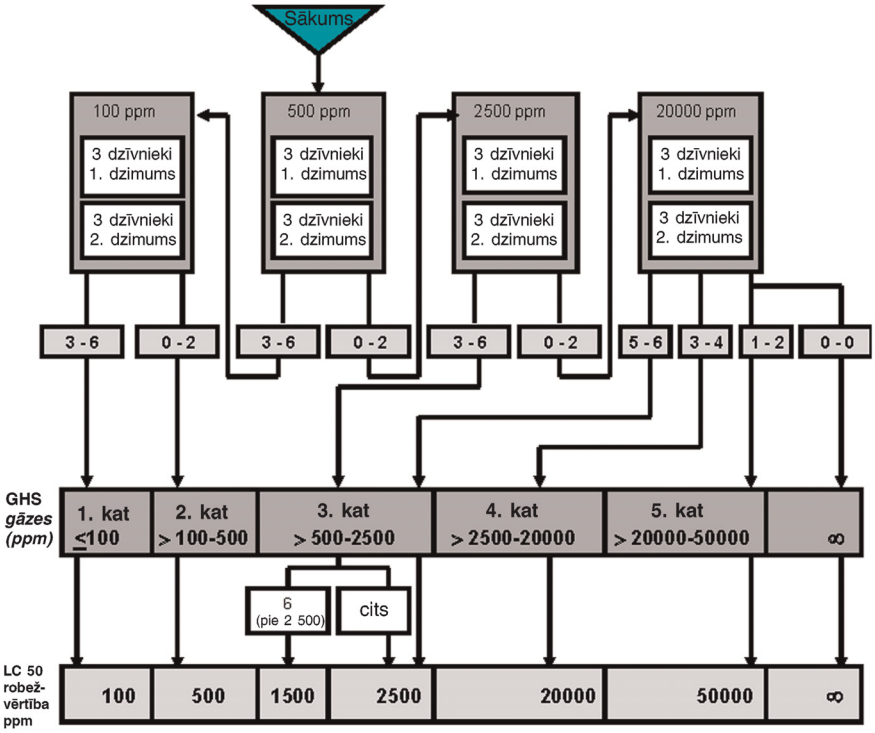
— Testēšana ar ≥ 20 000 ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

2.b papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 500 ppm/4 h gāzēm



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

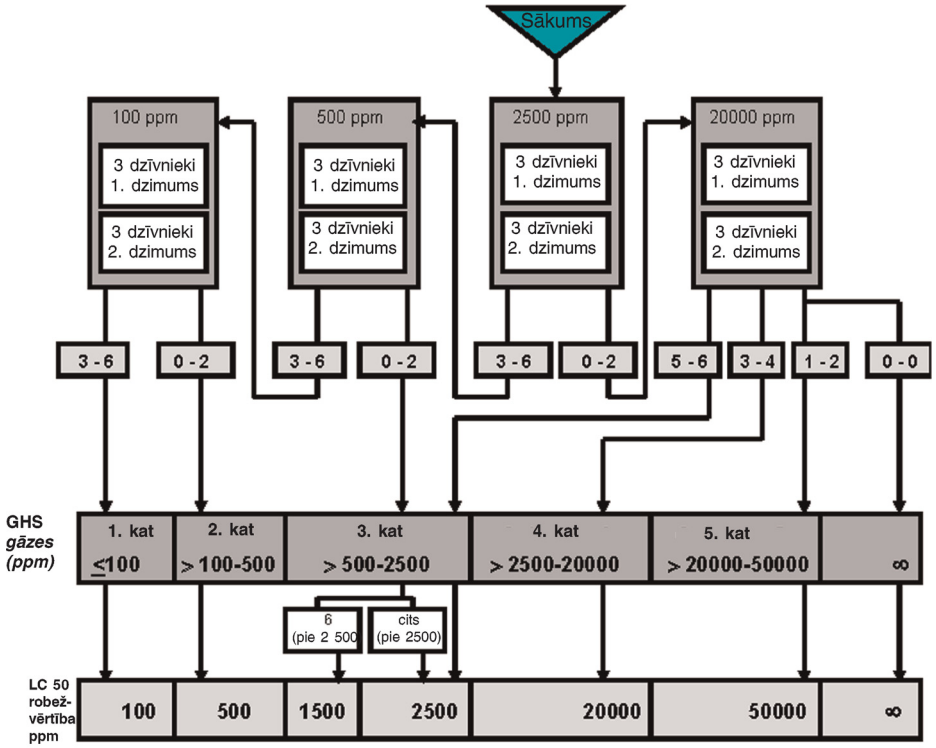
— Testēšana ar ≥ 20 000 ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

2.c papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 2 500 ppm/4 h gāzēm



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

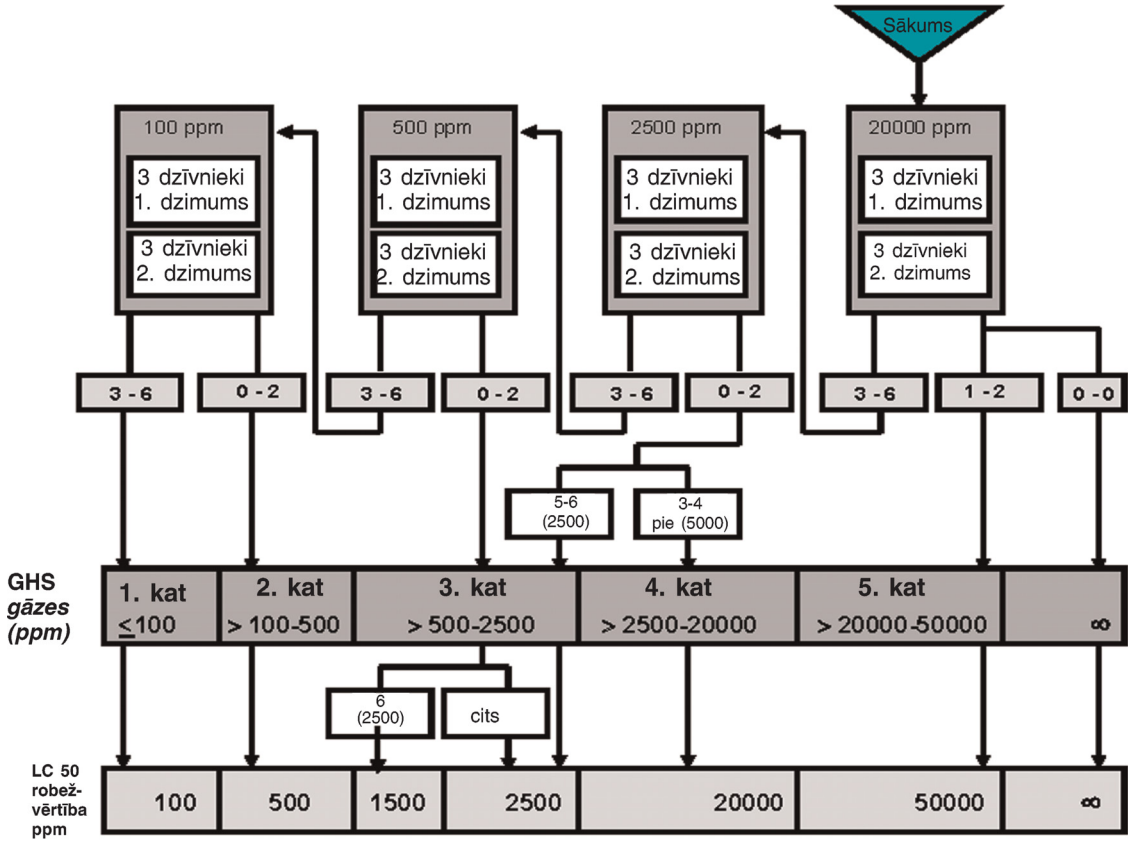
— Testēšana ar ≥ 20 000 ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

2.d papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 20 000 ppm/4 h gāzēm



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

— Testēšana ar ≥ 20 000 ppm/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼**M4**

3. papildinājums

Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra tvaikiem (mg/l/4 h)

Vispārīgas piezīmes ([1])

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

3.a papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 0,5 mg/l.

3.b papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 2 mg/l.

3.c papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 10 mg/l.

3.d papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 20 mg/l.

Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

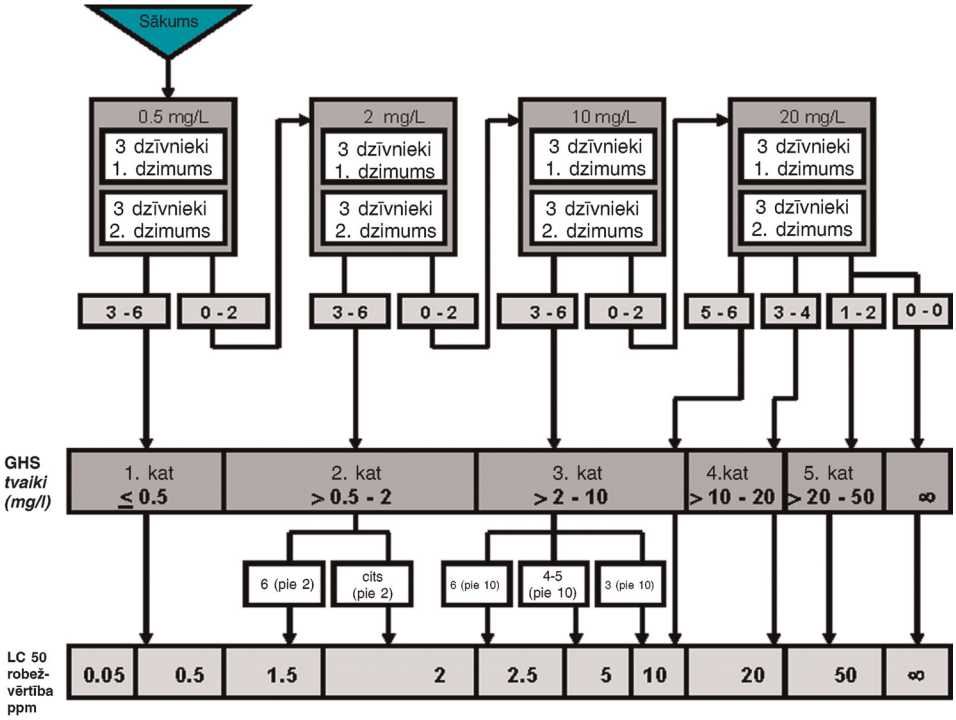
([1]) Turpmāk norādītajās tabulās ir atsauces uz Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (GHS). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

▼M4

3.a papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0,5 mg/l/4h tvaikiem



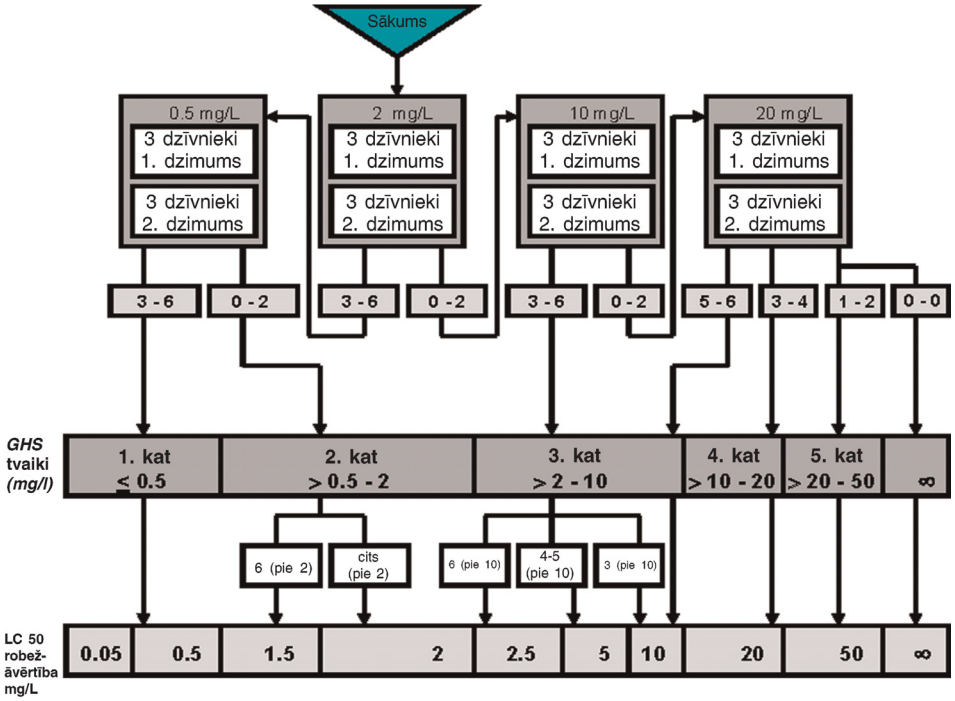
- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

3.b papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 2 mg/l/4 h tvaikiem



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— *GHS:* klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

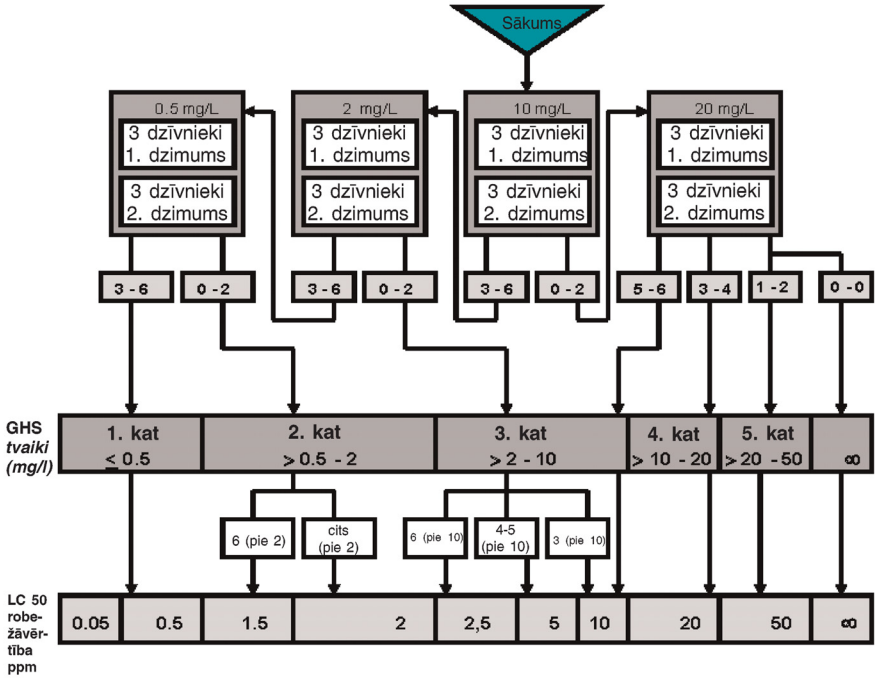
— Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

3.c papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 10 mg/l/4 h tvaikiem



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

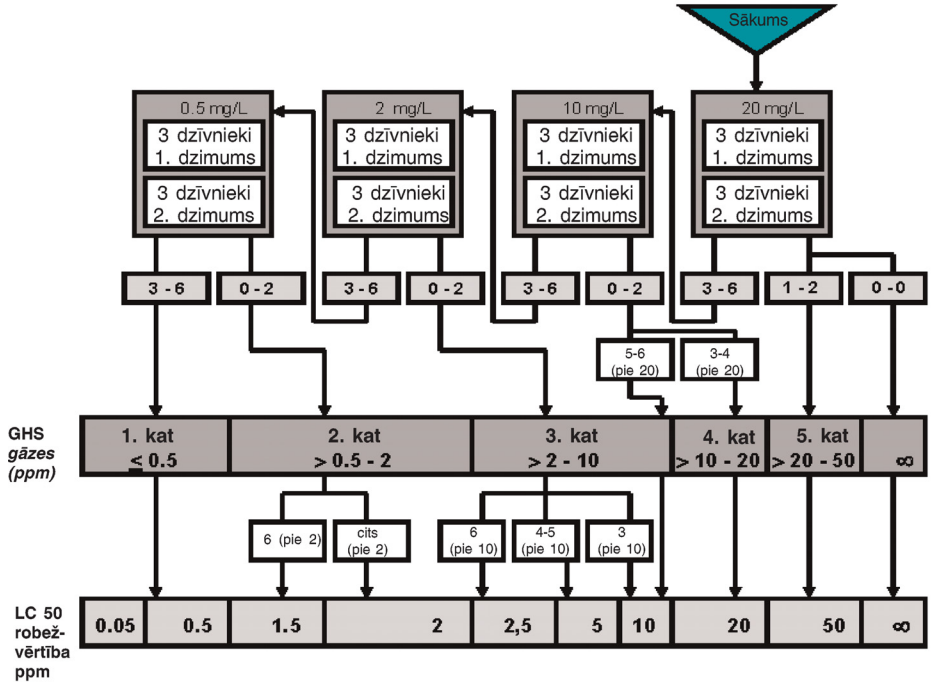
— Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

3.d papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 20 mg/l/4 h tvaikiem



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.

— GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.

— ∞: neklasificēts.

— Testēšana ar 50 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼**M4**

4. papildinājums

Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra aerosoliem (mg/l/4 h)

Vispārīgas piezīmes ([1])

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

4.a papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 0,05 mg/l.

4.b papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 0,5 mg/l.

4.c papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 1 mg/l.

4.d papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 5 mg/l.

Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

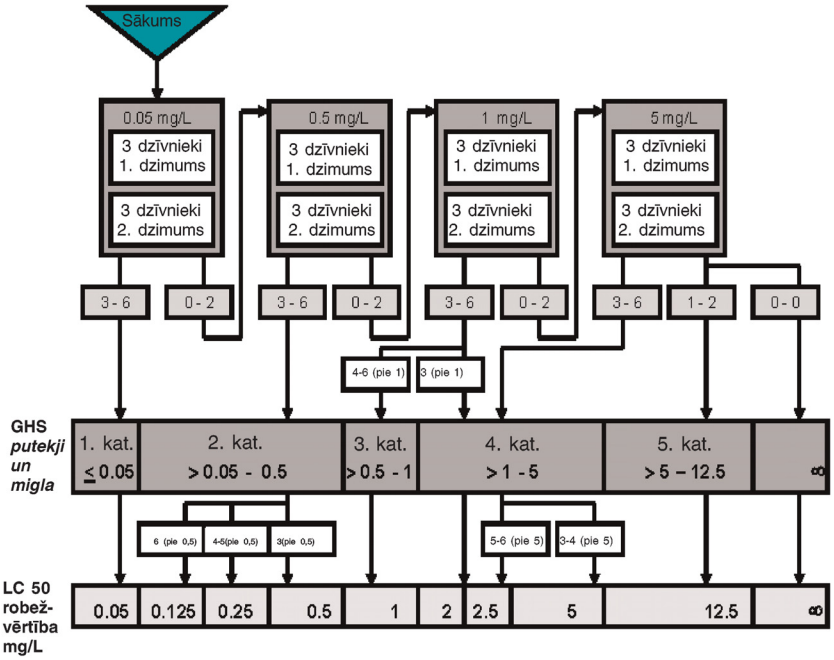
([1]) Turpmāk norādītajās tabulās ir atsauces uz Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (*GHS*). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

▼M4

4.a papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0.05 mg/L/4 h tvaikiem



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.

— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pār baudīto koncentrāciju.

— *GHS:* klasif icēšanas vispārēji saskaņotā sistēm a.

— ∞: neklasificēts.

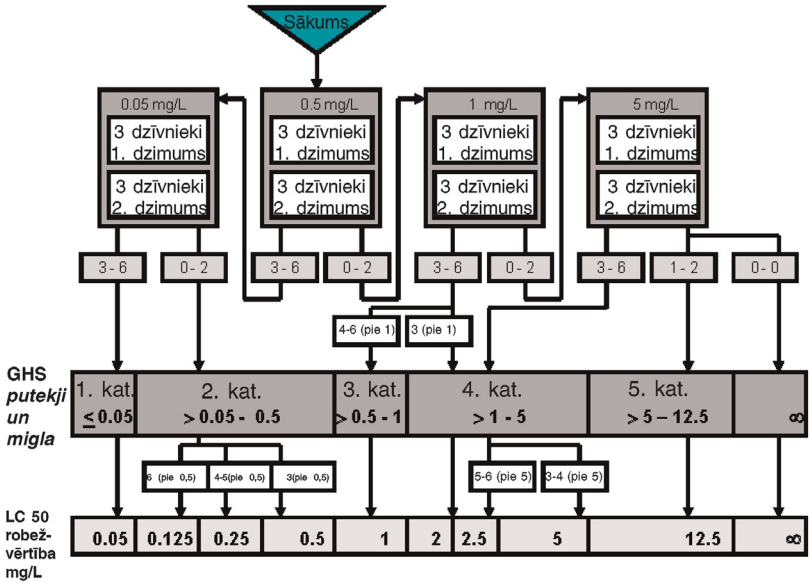
— Testēšana ar 12,5 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

4.b papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0,5 mg/l/4 h aerosoliem



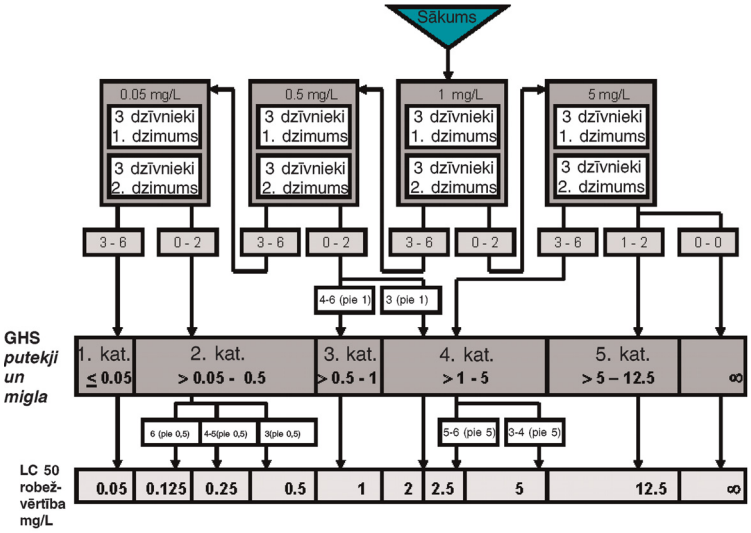
— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pār baudīto koncentrāciju.
— *GHS:* klasif icēšanas vispārēji saskaņotā sistēm a.
— ∞: neklasificēts.
— Testēšana ar 12,5 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

4.c papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 1 mg/l/4 h aerosoliem



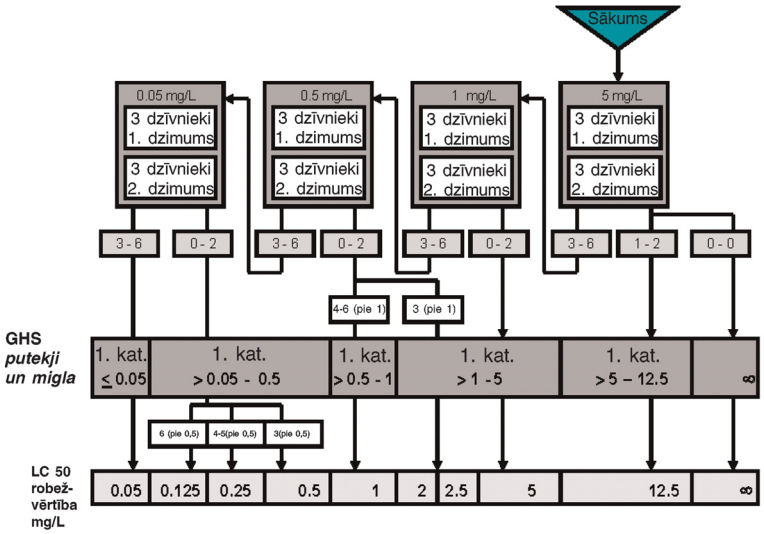
— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pār baudīto koncentrāciju.
— *GHS:* klasif icēšanas vispārēji saskaņotā sistēm a.
— ∞: neklasificēts.
— Testēšana ar 12,5 mg/L/ 4h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

▼M4

4.d papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 5 mg/l/4 h aerosoliem



— Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
— 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pār baudīto koncentrāciju.
— *GHS:* klasif icēšanas vispārēji saskaņotā sistēm a.
— ∞: neklasificēts.
— Testēšana ar 12,5 mg/L/ 4h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).”

▼M5

B.53. ONTOĢENĒZES NEIROTOKSICITĀTES PĒTĪJUMS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 426 (2007. gads). Kopenhāgenā 1995. gada jūnijā ESAO Reproduktīvās un ontoģenēzes toksicitātes darbgrupa apsprieda vajadzību atjaunināt esošos ESAO testēšanas norādījumus reproduktīvās un ontoģenēzes toksicitātes jomā un izstrādāt jaunus norādījumus attiecībā uz beigupunktiem, kas vēl nav aprakstīti (1). Darbgrupa ieteica, ka ontoģenēzes neirotoksicitātes testēšanas norādījumi ir jāsagatavo atbilstoši ASV *EPA* norādījumiem, kuri pēc minētā datuma ir pārskatīti (2). 1996. gada jūnijā Kopenhāgenā notika otrā konsultatīvā sanāksme ar mērķi informēt sekretariātu par jauno ontoģenēzes neirotoksicitātes testēšanas norādījumu izklāstu, aptverot galvenos aspektus, piemēram, norādījumus par dzīvnieku sugu izvēli, devas došanas periodu, testēšanas periodu, novērtējamos beigupunktus un rezultātu novērtēšanas kritērijus. ASV neirotoksicitātes riska novērtēšanas norādījumi tika publicēti 1998. gadā (3). 2000. gada oktobrī vienlaicīgi notika ESAO ekspertu konsultatīvā sanāksme un *ILSI* Riska zinātnes institūta seminārs, un 2005. gadā Tokijā notika ekspertu konsultatīvā sanāksme. Minēto sanāksmju mērķis bija pārrunāt zinātniskos un tehniskos jautājumus saistībā ar pašreizējiem testēšanas norādījumiem, un sanāksmēs sniegtie ieteikumi (4)(5)(6)(7) tika ņemti vērā, izstrādājot šo testēšanas metodi. Papildu informācija par šīs testēšanas metodes izmantošanu, iegūto rezultātu interpretāciju un terminoloģiju ir pieejama ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 43 "Reproduktīvās toksicitātes testēšana un novērtējums" (8) un Norādījumu dokumentā Nr. 20 "Neirotoksicitātes testēšana" (9).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

2. Vairākas ķīmiskās vielas cilvēkiem un citām sugām rada ontoģenēzes neirotoksicitātes risku (10)(11)(12)(13). Lai pārbaudītu un novērtētu ķīmiskās vielas toksiskās īpašības, var būt nepieciešams noteikt potenciālo ontoģenēzes neirotoksicitāti. Ontoģenēzes neirotoksicitātes pētījumus izstrādā tā, lai varētu iegūt datus, tostarp devas un atbildes reakcijas raksturojumu, par tādu iespējamu funkcionālu un morfoloģisku ietekmi uz pēcnācēja nervu sistēmu attīstības procesā, kuras iemesls var būt ekspozīcija *in utero* un dzīves sākumā.

3. Ontoģenēzes neirotoksicitātes pētījumu var veikt kā reproduktīvās toksicitātes un/vai pieaugušu dzīvnieku neirotoksicitātes pētījumā ietilpstošu pētījumu (piemēram, B.34. (14), B.35. (15), B.43. (16) testēšanas metode) vai to pievienot prenatālās ontoģenēzes toksicitātes pētījumam (piemēram, B.31. (17) testēšanas metode). Ja ontoģenēzes neirotoksicitātes pētījumu iekļauj citā pētījumā vai tādam pētījumam pievieno, ir ļoti svarīgi saglabāt abu pētījumu integritāti. Visiem testiem jābūt saskaņā ar piemērojamiem tiesību aktiem vai valdības un iestāžu norādījumiem par laboratorijas dzīvnieku izmantošanu pētījumos (piemēram, 18).

4. Pirms pētījuma sākšanas testēšanas laboratorijai ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Šādā informācijā ietilpst ķīmiskās vielas identitāte un struktūra, fizikālķīmiskās īpašības, citu to *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultāti, kur attiecīgā viela izmantota, toksikoloģiskie dati par strukturāli līdzīgām ķīmiskajām vielām un vielas paredzamais(-ie) lietošanas veids(-i). Šī informācija ir vajadzīga, lai nodrošinātu, ka tests atbilst nolūkam aizsargāt cilvēku veselību un ka tiek pareizi izraudzīta sākotnējā deva.

▼M5

TESTA PRINCIPS

5. Testējamo ķīmisko vielu ievada grūsniem dzīvniekiem un dzīvniekiem laktācijas periodā. Mātītes testē, lai novērtētu iedarbību uz grūsnām un barojošām mātītēm, un minētie pētījumi var arī sniegt salīdzinošu informāciju (par mātītēm un pēcnācējiem). Pēcnācējus, kuriem veic neirotoksicitātes novērtējumu, no metiena izvēlas nejaušināti. Pētījumā izdara novērojumus, lai noteiktu būtiskus neiroloģiskus un uzvedības traucējumus, arī lai novērtētu fizisko attīstību, uzvedības ontoģenēzi, motorisko aktivitāti, motoriskās un sensoriskās funkcijas un mācīšanos un atmiņu, kā arī smadzeņu svaru un neiropatoloģiju postnatālās attīstības periodā un pieaugušam dzīvniekam.

6. Ja testēšanas metodi izmanto kā atsevišķu pētījumu, papildu pieejamos dzīvniekus katrā grupā var izmantot noteiktām neiroizturēšanās, neiropatoloģiskām, neiroķīmiskām vai elektrofizioloģiskām procedūrām, kuras dod iespēju papildināt šai testēšanas metodē ieteicamajos standartizmeklējumos iegūtos datus (16)(19)(20)(21). Minētās papildu procedūras var īpaši noderēt, ja empīriskie novērojumi, gaidāmā iedarbība vai mehānismi/darbības veidi norāda uz noteikta veida neirotoksicitāti. Minētās papildu procedūras var izmantot gan mātītēm, gan mazuļiem. Turklāt var izmantot arī *ex vivo* vai *in vitro* procedūras, ja vien tās neietekmē *in vivo* procedūru integritāti.

SAGATAVOŠANĀS TESTAM

Dzīvnieku sugu izvēle

7. Testā ieteicamā suga ir žurka, bet vajadzības gadījumā var izmantot citas sugas. Tomēr jāņem vērā, ka šīs testēšanas metodes norādes attiecībā uz grūsnību un pēcdzemdību periodu atbilst parasti izmantotajām žurku līnijām, un ja izmanto citas sugas vai netipiskas dzīvnieku līnijas, jāizvēlas salīdzināmi periodi. Izmantojot citas sugas dzīvniekus, izvēle ir jāpamato ar toksikoloģijas, farmakokinētikas un/vai citiem datiem. Pamatojumā jānorāda, vai ir pieejams konkrētajai sugai raksturīgās pēcdzemdību neiroizturēšanās un neiropatoloģijas novērtējums. Ja iepriekš veiktos testos radušās bažas, jāapsver, vai neizmantot sugu/līniju, ar kuru radušās bažas. Dažādu sugu žurkām atbildes reakcija ir atšķirīga, un tāpēc ir jābūt pierādījumiem, ka izvēlētās līnijas vaislība un jutība ir atbilstīga. Ir jādokumentē citu sugu datu ticamība un jutība attiecībā uz ontoģenēzes neirotoksicitātes noteikšanu.

Turēšanas un barošanas nosacījumi

8. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā. Apgaismojuma ciklu var mainīt arī pirms pārošanās un uz visu pētījuma laiku, lai novērtētu funkcionālos un uzvedības beigupunktus laikā, kad telpās ir tumšs (sarkanajā apgaismojumā), t. i., laikā, kad dzīvnieki parasti ir aktīvi (22). Ja tiek mainīts gaismas un tumsas cikls, ir jānodrošina attiecīgs aklimatizācijas periods, lai dzīvnieki varētu pielāgoties jaunajam ciklam. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Ir jāreģistrē barības un ūdens veids un ir jāpārbauda, vai tie nav piesārņoti.

▼M5

9. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Pārotos dzīvniekus pēc kopulācijas vai ne vēlāk kā no grūtniecības 15. dienas tur atsevišķi dzemdību vai maternitātes būros. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Tuvojoties dzemdībām, sapārotajām mātītēm ir jānodrošina piemēroti un iepriekš noteikti materiāli migas veidošanai. Ir labi zināms, ka grūsnības laikā nepiemērota apiešanās vai stress var radīt negatīvas sekas, izraisīt augļa zaudēšanu un augļa un postnatālās attīstības izmaiņas. Lai izvairītos no augļa zaudēšanas, ko izraisa ar vielas ievadīšanu nesaistīti faktori, ar grūsniem dzīvniekiem ir jārīkojas uzmanīgi un ir jāizvairās no ārējo faktoru radīta stresa, piemēram, no pārmērīga ārpuses trokšņa.

Dzīvnieku sagatavošana

10. Pētījumā ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizējušies laboratorijas apstākļos un kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas, izņemot gadījumus, kur pētījums ietilpst citā pētījumā (skatīt 3. punktu). Testa dzīvniekiem ir jānorāda suga, līnija, izcelsme, dzimums, svars un vecums. Visus dzīvnieku marķē ar individuālu identifikācijas numuru. Visās testa grupās, cik vien tas praktiski iespējams, dzīvnieku svaram un vecumam jābūt vienādam, pētāmās sugas un līnijas standarta diapazonā. Visiem devas līmeņiem jāizmanto pieaugušas mātītes, kas nav dzemdējušas. Brāļus un māsas nedrīkst pārot, un jāraugās, lai to nepieļautu. Grūsnības 0. diena ir diena, kad novērots maksts embols un/vai sperma. Iegādājoties grūsnus dzīvniekus, tiem ir jānodrošina pietiekams aklimatizācijas periods (piemēram, 2–3 dienas). Sapārotās mātītes nejaušināti jāsadala kontroles un vielas ievadīšanas grupā, un dzīvnieki grupās ir jāsadala iespējami vienmērīgi (piemēram, grupās ieteicams ar stratificētas nejaušināšanas procedūru nodrošināt vienmērīgu sadalījumu pēc svara vai citos aspektos). Pa grupām vienmērīgi jāsadala ir arī mātītes, ko apsēklojis viens un tas pats tēviņš.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

11. Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai paredzēto grūsno mātīšu skaitam katrā testa un kontroles grupā jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu, ka tiek iegūts pietiekams skaits pēcnācēju neirotoksicitātes izvērtēšanai. Katrā devu līmenī ieteicams izmantot 20 metienus. Ja metienu kopskaits uz grupu ir nodrošināts un ja replicēto devu izmantošanu atspoguļo, izmantojot piemērotu statistisku modeli, drīkst izmantot replicētu devu ievadīšanas modeļus un modeļus, kuros atšķiras devu ievadīšanas sākumpunkts.

12. Pēc piedzimšanas 4. dienā vai pirms tam (piedzimšanas diena ir 0. diena pēc piedzimšanas), mazuļu skaits katrā metienā jākoriģē, liekos mazuļus nejaušināti likvidējot, lai nodrošinātu vienādu metienu lielumu (23). Metienu lielums nedrīkst pārsniegt izmantotās grauzēju līnijas metiena vidējo lielumu (8–12). Metienā ir jāatstāj iespējami vienāds skaits vīriešu un sieviešu dzimuma mazuļu. Selektīva mazuļu likvidēšana, piemēram, balstoties uz ķermeņa svaru, nav pieļaujama. Pēc metiena standartizēšanas (lieko likvidēšanas) un pirms funkcionālo beigupunktu turpmākas testēšanas katram atsevišķam mazulim, ko paredzēts izmantot testēšanai pirms vai pēc atšķiršanas no mātes, piešķir unikālu identifikāciju, izmantojot jebkādu mazuļiem piemērotu, humānu identifikācijas metodi (piemēram, (24)).

▼M5

Dzīvnieku grupēšana funkcionālajiem un uzvedības testiem, smadzeņu svara noteikšanai un neiropatoloģiskai izvērtēšanai

13. Šī testēšanas metode paredz iespēju izmantot dažādas pieejas, kā *in utero* un laktācijas periodā eksponētus dzīvniekus grupēt izmantošanai funkcionālos un uzvedības testos, dzimumbrieduma testos, smadzeņu svara noteikšanai un neiropatoloģiskai izvērtēšanai (25). Atsevišķi var iekļaut citus neiroizturēšanās funkciju (piemēram, sociālās uzvedības), neiroķīmijas vai neiropatoloģijas testus, ja tas neapdraud pamata testu integritāti.

14. Beigupunktu novērtēšanai mazuļus no katras grupas, kas saņem vienādu devu, izraugās un sadala 4. dienā pēc piedzimšanas vai vēlāk. Mazuļus atlasa tā, lai visos testos no katra vienas devas grupas metiena pēc iespējas būtu pārstāvēti abi dzimumi. Motoriskās aktivitātes testos visos vecuma posmos pirms atšķiršanas no mātes testē vienu un to pašu vīrišķā un sievišķā dzimuma mazuļu pāri (skatīt 35. punktu). Dažādos citos uzvedības testēšanas testos var izmantot vienu un to pašu tēviņa un mātītes pāri vai citus pārus. Lai kognitīvo funkciju mērījumos izvairītos no ietekmes, kas saistīta ar vecumu un iepriekšēju apmācību (26) (27), no mātes atšķirto mazuļu un pieaugušo dzīvnieku kognitīvo funkciju testu rezultātu salīdzināšanai var būt nepieciešams ņemt atšķirīgus mazuļus. Mazuļus atšķirot no mātes (21. dienā pēc piedzimšanas), tos, kurus neizraugās testēšanai, var humāni nonāvēt. Visas mazuļu sadalījuma izmaiņas ir jāreģistrē. Statistiskajai mērvienībai ir jābūt metienam (vai mātītei), nevis mazulim.

15. Ir dažādi veidi, kā mazuļus iedalīt pārbaudēm pirms un pēc atšķiršanas no mātes, kognitīvajiem testiem, patoloģiju pārbaudēm utt. (skatīt 1. attēlu, kur sniegta vispārīga shēma, un 1. papildinājumu, kur norādīti iedalījuma piemēri). Ieteicamais minimālais dzīvnieku skaits pārbaudēm pirms un pēc atšķiršanas no mātes katrā devas grupā ir šāds:

Klīniskie novērojumi un ķermeņa svars	Visi dzīvnieki
Detalizēti klīniskie novērojumi	20 no katra dzimuma (1 no katra dzimuma uz metienu)
Smadzeņu svars (pēc fiksācijas) 11.–22. dienā pēc piedzimšanas	10 no k. dzimuma (1 no metiena)
Smadzeņu svars (bez fiksācijas), apmēram 70. dienā pēc piedzimšanas	10 no k. dzimuma (1 no metiena)
Neiropatoloģija (iegremdēšana vai fiksācija ar perfūziju), 11.–22. dienā pēc piedzimšanas	10 no k. dzimuma (1 no metiena)
Neiropatoloģija (fiksācija ar perfūziju) apmēram 70. dienā pēc piedzimšanas	10 no k. dzimuma (1 no metiena)
Dzimumbriedums	20 no k. dzimuma (1 no k. dzimuma uz metienu)
Citi attīstības parametri (pēc izvēles)	Visi dzīvnieki
Uzvedības ontoģenēze	20 no k. dzimuma (1 no k. dzimuma uz metienu)
Motoriskā aktivitāte	20 no k. dzimuma (1 no k. dzimuma uz metienu)
Motoriskās un sensoriskās funkcijas	20 no k. dzimuma (1 no k. dzimuma uz metienu)
Mācīšanās un atmiņa	10 no k. dzimuma ([a]) (1 no metiena)

([a]) Atkarībā no kognitīvo funkciju testu jutīguma ir jāapsver, vai nepārbaudīt daudz vairāk dzīvnieku, piemēram, līdz pat 1 tēviņam un 1 mātītei no katra metiena (informāciju par dzīvnieku iedalīšanu skatīt 1. papildinājumā) (papildu norādījumi par parauga izlases lielumu ir minēti ESAO Testēšanas norādījumos 43 (8)).

▼M5

Dozēšana

16. Izmanto vismaz trīs devu līmeņus un vienlaicīgas kontroles grupu. Devu līmeņu intervālam jābūt tādam, lai būtu vērojama toksiskās iedarbības gradācija. Ja vien augstāko devas līmeni neierobežo ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās vai bioloģiskās īpašības, šis līmenis jāizvēlas ar mērķi izraisīt maternālo toksicitāti (piemēram, klīniski simptomi, samazināts ķermeņa svara pieaugums (ne vairāk kā 10 %) un/vai pazīmes, ka mērķorgānu toksicitāti ietekmē devas līmenis). Augstākā deva var būt līdz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izņemot atsevišķus gadījumus. Piemēram, sagaidāmā cilvēku ekspozīcija var norādīt uz to, ka jāizmanto augstāka deva. Lai noteiktu augstāko devas līmeni, kas jāizmanto un kam būtu jārada minimāls maternālās toksicitātes līmenis, var arī veikt izmēģinājuma pētījumus vai iepriekšējus devu līmeņa noteikšanas pētījumus. Ja tas, ka testējamā ķīmiskā viela ietekmē attīstību, konstatēts ontoģenēzes toksicitātes standartpētījumā vai izmēģinājuma pētījumā, augstākais devas līmenis ir maksimālā deva, kas neradīs pārmērīgu pēcnācēja toksicitāti vai bojāeju *in utero* vai neonatālajā periodā un ar ko pietiek, lai pamatoti izvērtētu toksicitāti. Zemākajam devas līmenim būtu jābūt tādam, lai nerastos maternālās vai ontoģenēzes toksicitātes, tostarp neirotoksicitātes, pazīmes. Devu līmeņi jāizraugās to samazinājuma virzienā tā, lai parādītos jebkāda ar devu saistīta atbildes reakcija un lai zemākais devas līmenis būtu nenovērojamas nelabvēlīgas ietekmes līmenis (*NOAEL*), vai jāizraugās noteikšanas robežai tuvas devas, kas varētu palīdzēt noteikt etalondevu. Devu līmeņu noteikšanai to samazinājuma virzienā optimums bieži vien ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto devu grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

17. Devu līmeņi ir jāizvēlas, ņemot vērā visus esošos toksicitātes datus, kā arī papildu informāciju par testējamās ķīmiskās vielas vai ar to saistītu materiālu metabolismu un toksikokinētiku. Minētā informācija var arī palīdzēt parādīt devu došanas režīma piemērotību. Vai devas mazuļiem nedot tieši, ir jāapsver, balstoties uz ekspozīciju un farmakokinētisko informāciju (28)(29). Pirms veikt pētījumus ar tiešu devu došanu, ir rūpīgi jāizvērtē priekšrocības un trūkumi (30).

18. Vienlaicīgas kontroles grupai jāsaņem placebo vai nesējviela, ja pēdējo testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto. Visiem dzīvniekiem parasti jādod vienāds testējamās ķīmiskās vielas vai nesējvielas tilpums attiecībā pret ķermeņa svaru. Ja devu došanā izmanto nesējvielu vai citu piedevu, jāņem vērā šādas īpašības – ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas uzsūkšanos, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; tāda ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kas var mainīt tās toksiskās īpašības; un ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojuma stāvokli. Nesējvielas ietekme nedrīkst traucēt pētījuma interpretāciju, tai nedrīkst piemist neiroizturēšanās toksicitāte un tā nedrīkst ietekmēt reprodukciju vai attīstību. Jaunām nesējvielām papildus nesējvielas kontroles grupai jāizmanto placebo saņēmēja kontroles grupa. Ar kontroles grupas(-u) dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem.

▼M5

Devu ievadīšana

19. Jāizraugās tāds testējamās ķīmiskās vielas vai nesējvielas ievadīšanas ceļš, kas visvairāk atbilst cilvēka ekspozīcijas gadījumam, un jābalstās uz pieejamo informāciju par tās metabolismu un izplatīšanos testa dzīvnieku organismā. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli (piemēram, ar mākslīgo barošanu vai ar uzturu vai dzeramo ūdeni), bet, ņemot vērā vielas īpašības un tās paredzamo vai zināmo iedarbību uz cilvēkiem, var izmantot arī citus veidus (piemēram, caur ādu vai ar inhalāciju) (papildu norādījumi ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 43(8)). Izraudzītais ievadīšanas ceļš ir jāpamato. Testējamā ķīmiskā viela katru dienu ir jāievada aptuveni vienā laikā.

20. Katram dzīvniekam ievadīto devu parasti izvēlas atkarībā no pēdējā noteiktā individuālā ķermeņa svara. Tomēr grūsnības pēdējā trešdaļā deva jānosaka piesardzīgi. Ja vielu saņēmušajām mātītēm ir novērojama pārmērīga toksicitāte, tādi dzīvnieki ir humāni jānonāvē.

21. Testējamo ķīmisko vielu vai nesējvielu sapārotajām mātītēm ievada vismaz katru dienu, sākot ar implantācijas brīdi (grūsnības 6. dienā), visu laktācijas periodu (21. diena pēc piedzimšanas), lai mazuļus testējamai ķīmiskai vielai eksponētu prenatālās un postnatālās neiroloģiskās attīstības periodā. Ja pierādījumi liecina, ka kāds (cits) eksperimenta plāns cilvēka ekspozīcijas gadījumam ir vairāk piemērots, devas ievadīšanas sākuma vecumu, kā arī tās ievadīšanas ilgumu un biežumu var koriģēt. Devas ievadīšanas ilgumu citām sugām pielāgo tā, lai nodrošinātu ekspozīciju visos smadzeņu attīstības sākumposmos (piemēram, periodos, kas līdzvērtīgi cilvēka smadzeņu attīstībai prenatālajā periodā un postnatālā perioda sākumā). Devu var sākt ievadīt, grūsnībai sākoties (tās 0. dienā), bet jāņem vērā, ka testējamā ķīmiskā viela var izraisīt (augļa) bojāeju pirms implantācijas. Ja devu ievada, sākot ar grūsnības 6. dienu, minētais risks nepastāv, bet tādā gadījumā attīstības stadijās no grūsnības 0. dienas līdz 6. dienai deva nebūtu ievadīta. Ja laboratorija iegādājas sapārotus dzīvniekus, grūsnības 0. dienā devu ievadīt sākt nav iespējams, un tādā gadījumā devu var sākt ievadīt grūsnības 6. dienā. Testēšanas laboratorijai devu došanas režīms ir jānosaka, ņemot vērā attiecīgo informāciju par testējamās ķīmiskās vielas ietekmi, iepriekšēju pieredzi un loģistikas apsvērumus; var būt gadījumi, kur devu turpina ievadīt arī pēc atšķiršanas no mātes. Atnešanās dienā dzīvniekiem, kam dzemdību process vēl nav beidzies, devu ievadīt nedrīkst. Kopumā tiek pieņemts, ka mazuļi testējamo ķīmisko vielu saņem ar mātes pienu, tomēr, ja trūkst pierādījumu tam, ka pēcnācējs joprojām ir eksponēts ķīmiskajai vielai, ir jāizvērtē iespēja mazuļiem pārbaudāmo vielu ievadīt tieši. Pierādījumu tam, ka testējamā ķīmiskā viela joprojām iedarbojas, var sniegt, piemēram, farmakokinētiskā informācija, pēcnācēja toksicitāte vai biomarķieru izmaiņas (28).

NOVĒROJUMI

Mātīšu novērošana

22. Visas mātītes vismaz reizi dienā ir rūpīgi jānovēro attiecībā uz to veselības stāvokli, tostarp saslimstību un mirstību.

23. Vielas ievadīšanas un novērošanas periodā periodiski jāveic detalizētāki klīniskie novērojumi (vismaz divas reizes attiecībā uz devu ievadīšanu grūsnības laikā un divas reizes attiecībā uz devu ievadīšanu laktācijas periodā), katrā devas līmenī izmantojot vismaz desmit mātītes. Dzīvnieki ir jānovēro ārpus turēšanas būra, un tas jādara par vielas ievadīšanu neinformētiem apmācītiem tehniskajiem darbiniekiem, dzīvnieku stresa un novērotāja neobjektivitātes mazināšanai un atsevišķo novērotāju iegūto rezultātu ticamības paaugstināšanai izmantojot standartprocedūras. Ja iespējams, ieteicams, ka attiecīgā pētījuma ietvaros novērojumus veic viens un tas pats tehniskais darbinieks.

▼M5

24. Novērotās pazīmes ir jāreģistrē. Kad vien tas īstenojams, ir jāreģistrē arī novēroto pazīmju izpausmes stiprums. Klīniskajos novērojumos jāiekļauj (bet ne tikai) pārmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrēcijas un veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametrs, neraksturīga elpošana un/vai elpošana caur muti un neparastas urinācijas vai defekācijas pazīmes).

25. Jāatzīmē arī neparastas atbildes reakcijas, kas izpaužas ķermeņa stāvoklī, aktivitātes līmenī (piemēram, samazināta vai pastiprināta standartiežogojuma pētīšana) un kustību koordinācijā. Jāreģistrē pārmaiņas gaitā (piemēram, gāzelēšanās, ataksija), stājā (piemēram, sakumpusi mugura) un atbildes reakcijās uz manipulācijām, novietošanu vai citiem vides stimuliem, kā arī klonisko vai tonisko kustību esamība, krampji, drebēšana, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, neparastas galvas kustības, atkārtota riņķošana) vai savāda izturēšanās (piemēram, košana vai pārmērīga laizīšana, pašsakropļošanās, staigāšana atpakaļvirzienā, skaņu izdošana) vai agresivitāte.

26. Toksicitātes pazīmes ir jāreģistrē, norādot arī to sākšanās dienu, laiku, smagumu un ilgumu.

27. Dzīvnieki ir jānosver vielas ievadīšanas reizē vismaz reizi nedēļā visu pētījuma laiku, dzemdību dienā vai neilgi pirms tās, kā arī 21. pēcdzemdību dienā (atšķiršanas brīdī). Pētījumos ar mākslīgo barošanu mātītes ir jāsver vismaz divas reizes nedēļā. Deva ir attiecīgi jāpielāgo, katru reizi nosakot ķermeņa svaru. Grūsnības un laktācijas periodā barības patēriņu mēra vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni, vismaz reizi nedēļā ir jāmēra ūdens patēriņš.

Pēcnācēju novērošana

28. Visi pēcnācēji vismaz reizi dienā ir rūpīgi jānovēro un jāreģistrē toksicitātes, saslimstības un mirstības pazīmes.

29. Vielas ievadīšanas un novērošanas laikā jāizdara detalizētāki pēcnācēju klīniskie novērojumi. Pēcnācēji (vismaz viens mazulis no katra dzimuma metienā) ir jānovēro par vielas ievadīšanu neinformētiem apmācītiem tehniskajiem darbiniekiem, dzīvnieku stresa un novērotāja neobjektivitātes mazināšanai un atsevišķo novērotāju iegūto rezultātu ticamības paaugstināšanai izmantojot standartprocedūras. Ja iespējams, ieteicams, ka novērojumus veic viens un tas pats tehniskais darbinieks. Ir jāuzrauga vismaz 24. un 25. punktā minētie beigupunkti, ņemot vērā attīstības stadiju, kas tiek novērota.

30. Visas pēcnācēja toksicitātes pazīmes ir jāreģistrē, norādot arī to sākšanās dienu, laiku, smagumu un ilgumu.

Fiziskie parametri un attīstības parametri

31. Pārmaiņas attīstības parametros (piemēram, auss gliemežnīcas atvēršanās, acu atvēršanās, priekšzobu parādīšanās) pirms atšķiršanas no mātes cieši korelē ar ķermeņa svaru (30)(31). Ķermeņa svars var būt vislabākais fiziskās attīstības rādītājs. Tāpēc attīstības parametrus ieteicams mērīt tikai tad, ja jau ir pierādījumi, ka no šiem beigupunktiem varēs gūt papildu informāciju. Minēto parametru novērtēšanas laiks ir norādīts 1. tabulā. Atkarībā no gaidāmās ietekmes un sākotnējo mērījumu rezultātiem var būt ieteicams noteikt papildu laikus vai veikt mērījumus citās attīstības stadijās.

▼M5

32. Novērtējot fizisko attīstību, ieteicams ņemt vērā pēcdzimumakta vecumu, nevis postnatālo vecumu (33). Ja mazuļus pārbauda dienā, kad tos atšķir no mātes, pārbaudi ieteicams veikt pirms faktiskās atšķiršanas, lai izvairītos no nelabvēlīgās ietekmes, ko rada stress sakarā ar mazuļa atšķiršanu no mātes. Turklāt pārbaudes pēc atšķiršanas no mātes mazulim nedrīkst veikt divās pirmajās pēcatšķiršanas dienās.

1. tabula

Fiziskās un attīstības atšķirību novērtējuma grafiks un funkcionālie/uzvedības beigupunkti ([a])

Vecuma periodi / Beigupunkti	Pirms atšķiršanas ([b])	Pusaugu dzīvnieki ([b])	Jauni pieaugušie ([b])
Fiziskie parametri un attīstības parametri			
Ķermeņa svars un klīniskie novērojumi	reizi nedēļā ([c])	vismaz reizi divās nedēļās	vismaz reizi divās nedēļās
Smadzeņu svars	22. dienā pēc piedzimšanas ([d])		beigās
Neiropatoloģija	22. dienā pēc piedzimšanas ([d])		beigās
Dzimumbriedums	—	pēc vajadzības	—
Citi attīstības parametri ([e])	pēc vajadzības	—	—
Funkcionālie/uzvedības beigupunkti			
Uzvedības ontoģenēze	vismaz divi mērījumi		
Motoriskā aktivitāte (tostarp pieraduma veidošanās)	1–3 reizes ([f])	—	vienu reizi
Motoriskās un sensoriskās funkcijas	—	vienu reizi	vienu reizi
Mācīšanās un atmiņa	—	vienu reizi	vienu reizi

([a]) Šajā tabulā ir norādīts minimālais mērījumu skaits. Atkarībā no gaidāmās iedarbības un sākotnējo mērījumu rezultātiem var būt ieteicams noteikt papildu laikus (piemēram, veciem dzīvniekiem) vai veikt mērījumus citās attīstības stadijās.

([b]) Ieteicams mazuļus nepārbaudīt divas dienas pēc atšķiršanas no mātes (skatīt 32. punktu). Ieteicamais vecums, kad pārbaudīt pusaugu dzīvniekus, ir šāds: mācīšanās un atmiņa = 25. dienā pēc piedzimšanas (± 2 dienas); motoriskās un sensoriskās funkcijas = 25. dienā pēc piedzimšanas (± 2 dienas). Jaunu pieaugušu dzīvnieku pārbaudēm ieteicamais vecums ir laiks ir 60.–70. diena pēc piedzimšanas.

([c]) Ja devu mazuļiem ievada tieši, vismaz divreiz nedēļā jānosaka ķermeņa svars, lai varētu koriģēt devas periodā, kad ķermeņa svars strauji aug.

([d]) Smadzeņu svaru un neiropatoloģiju var novērtēt mazliet agrāk (piemēram, 11. dienā pēc piedzimšanas), ja tas ir vajadzīgs (sk. 39. punktu).

([e]) Vajadzības gadījumā (sk. 31. punktu) papildus ķermeņa svaram jāreģistrē arī citi attīstības parametri (piemēram, acu atvēršanās).

([f]) Sk. 35. punktu.

33. Dzīvie mazuļi ir jāsaskaita un jāsadala pēc dzimuma, piemēram, veicot vizuālu pārbaudi vai izmērot anogenitālo atstatumu (34)(35), un katrs metiena mazulis ir atsevišķi jānosver iespējami drīz pēc dzimšanas, laktācijas periodā – vismaz reizi nedēļā un vismaz reizi divās nedēļās pēc laktācijas perioda. Vērtējot dzimumbriedumu, no katra metiena vismaz vienam tēviņam un vienai mātītei ir jānosaka dzīvnieka vecums un ķermeņa svars tad, kad notiek maksts atvēršanās (36) vai preputiālā atdalīšanās (37).

▼M5

Uzvedības ontoģenēze

34. Izraudzītu uzvedības modeļu ontoģenēze attiecīgā vecumā jāmēra vismaz vienam mazulim no katra dzimuma metienā, un visās testēšanas dienās visu uzvedības modeļu novērtēšanā izmanto vienus un tos pašus mazuļus. Lai noteiktu normālu attiecīgā uzvedības modeļa ontoģenēzi vai ar vielas ievadīšanu saistītas ontoģenēzes izmaiņas, mērījumu dienas attiecīgajā periodā ir jāsadala vienmērīgi (38). Turpmāk tekstā ir minēti daži uzvedības modeļi, kuru ontoģenēze varētu būt jānovērtē: iztaisnošanas reflekss, negatīvā ģeotakse un motoriskā aktivitāte (38)(39)(40).

Motoriskā aktivitāte

35. Motoriskā aktivitāte ir jāmonitorē (41)(42)(43)(44)(45), pirms mazulis tiek atšķirts no mātes un pieauguša dzīvnieka dzīves posmā. Kā veikt pārbaudi, kad mazulis ir atšķirts no mātes, sk. 32. punktā. Testēšanas seansam ir jābūt pietiekami ilgam, lai vielu nesaņēmušiem kontroldzīvniekiem tā laikā izveidotos pieradums. Motorisko aktivitāti ļoti ieteicams izmantot, lai novērtētu uzvedības ontoģenēzi. Visās uzvedības ontoģenēzes testēšanas sesijās pirms mazuļa atšķiršanas no mātes ir jāizmanto vieni un tie paši dzīvnieki. Testēšana ir jāveic pietiekami bieži, lai ontoģenēzes aspektā varētu novērtētu pieraduma veidošanos sesijas laikā (44). Šajā nolūkā var būt jāizmanto trīs vai vairāk periodi pirms atšķiršanas no mātes un atšķiršanas dienā (piemēram, 13., 17. un 21. dienā pēc piedzimšanas). Tie paši vai tā paša metiena dzīvnieki arī ir jātestē pieauguša dzīvnieka dzīves posmā tuvu pētījuma beigām (piemēram, 60.–70. diena pēc piedzimšanas). Pēc nepieciešamības testēšanu veic papildu dienās. Motoriskā aktivitāte jāmonitorē ar automātisku aktivitātes reģistrēšanas iekārtu, kurai jāspēj konstatēt gan aktivitātes pieaugumu, gan samazināšanos (t. i., saskaņā ar ierīces mērījumiem pamataktivitātes līmenis nedrīkst būt tik zems, lai nevarētu noteikt aktivitātes samazināšanos, vai tik augsts, lai nevarētu noteikt aktivitātes paaugstināšanos). Katra ierīce ir jātestē, izmantojot standartprocedūras, lai iespēju robežās nodrošinātu, ka visā darbības laikā ierīču kopums darbojas uzticami. Iespēju robežās vielas ievadīšanas grupas attiecībā uz ierīcēm jāsadala vienmērīgi. Katrs dzīvnieks ir jāpārbauda atsevišķi. Vielas ievadīšanas grupās jānodrošina arī testēšanas laiku līdzsvars, lai nelabvēlīgu ietekmi neradītu aktivitātes diennakts ritmi. Ir jācenšas nodrošināt, lai izmaiņas testa apstākļos būtu minimālas un nebūtu sistemātiski saistītas ar vielas ievadīšanu. Starp mainīgajiem lielumiem, kas var ietekmēt daudzus uzvedības mērījumus, tostarp motorisko aktivitāti, ir trokšņa līmenis, testēšanas būra izmērs un forma, temperatūra, relatīvais mitrums, apgaismojums, aromāts, dzīvnieka turēšanas būra vai jauna testēšanas būra izmantošana un apkārtējās vides ietekme.

Motoriskās un sensoriskās funkcijas

36. Motoriskās un sensoriskās funkcijas ir detalizēti jāpārbauda vismaz vienu reizi pusaudzībā un vienu reizi jauna pieaugušā dzīvnieka dzīves posmā (piemēram, 60.–70. dienā pēc piedzimšanas). Kā veikt pārbaudi, kad mazulis ir atšķirts no mātes, sk. 32. punktā. Ir jāveic pietiekamas pārbaudes, lai nodrošinātu pietiekami daudz sensorisko modalitāšu (piemēram, somatosensorika, vestibulārs) un motorisko funkciju (piemēram, spēks, koordinācija) paraugu. Daži motorisko un sensorisko funkciju testu piemēri ir atliecējmuskuļa reflekss (46), iztaisnošanās reflekss (47)(48), pierašana pie dzirdes kairinātājiem (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) un impulsa testi (55).

▼M5

Mācīšanās un atmiņas testi

37. Asociatīvās mācīšanās un atmiņas tests ir jāveic pēc dzīvnieka atšķiršanas no mātes (piemēram, 25. dienā (± 2 dienas)) un jauniem pieaugušiem dzīvniekiem (60. dienā pēc piedzimšanas vai vēlāk). Kā veikt pārbaudi, kad mazulis ir atšķirts no mātes, sk. 32. punktā. Minētajos divos attīstības posmos var izmantot vienu(-s) un to(-s) pašu(-us) vai atsevišķu(-us) testu(-us). Iespējamas nelielas atkāpes, izvēloties mācīšanās un atmiņas testu(-us) žurkām, kas atšķirtas no mātes, un pieaugušām žurkām. Tomēr testiem ir jābūt izstrādātiem tā, lai tie atbilstu diviem kritērijiem. Pirmkārt, mācīšanās ir jānovērtē kā izmaiņas, kas vairākos atkārtotas mācīšanās mēģinājumos vai sesijās vērojamas savstarpējā salīdzinājumā, vai – attiecībā uz testiem ar vienu mēģinājumu – salīdzinājumā ar etalonstāvokli, kas kontrolē mācīšanās pieredzes neasociatīvo ietekmi. Otrkārt, papildus standarta mācīšanai (iemaņu apgūšana) testā(-os) ir jāiekļauj daži atmiņas (īstermiņa vai ilgtermiņa) novērtēšanas pasākumi, bet šādu atmiņas novērtēšanu pārskatā var iekļaut tikai tad, ja tajā pašā testā ir iegūts mērījums attiecībā uz iemaņu apgūšanu. Ja mācīšanās un atmiņas testa(-u) rezultāti liecina par testējamās ķīmiskās vielas ietekmi, jāapsver, vai neveikt papildu testus, lai izslēgtu citu interpretāciju, kuras pamatā ir sensoriskas izmaiņas, motivācijas un/vai kustībspējas izmaiņas. Papildus minētajiem diviem kritērijiem, ja informācijas avotos attiecīga informācija ir pieejama, mācīšanās un atmiņas testu ieteicams izraudzīties, ņemot vērā pierādītu jutību pret ķīmiskajām vielām, kas pieder pie testējamās vielas klases. Ja minētā informācija nav pieejama, lai nodrošinātu atbilstību minētajiem kritērijiem, var sagatavot, piemēram, šādus testus: pasīvā izvairīšanās (43)(56)(57), kavēta pielāgošanās stāvoklim pieaugušām žurkām (58) un žurku mazuļiem (59), ožas kondicionēšana (43)(60), *Morris* ūdens labirints (61)(62)(63), Bīla vai Cincinati labirints (64)(65), radiāllabirints (66), T veida labirints (43) un ar grafiku kontrolētas uzvedības apguve un saglabāšana (26)(67)(68). Citi testi ir aprakstīti literatūras avotos par žurkām, kas atšķirtas no mātes (26)(27), un pieaugušām žurkām (19)(20).

Autopsija

38. Mātesdzīvniekus pēc pēcnācēja atšķiršanas var humāni nonāvēt.

39. Pēcnācējus neiropatoloģiski izvērtē, izmantojot to dzīvnieku audus, kas humāni nonāvēti 22. dienā pēc piedzimšanas vai agrāk, laikā no 11. dienas līdz 22. dienai pēc piedzimšanas, kā arī pētījuma beigās. Attiecībā uz pēcnācējiem, ko nonāvē 22. dienā pēc piedzimšanas, jānovērtē smadzeņu audi, bet attiecībā uz dzīvniekiem, kurus nonāvē pētījuma beigās – centrālās nervu sistēmas (CNS) audi un perifērās nervu sistēmas (PNS) audi. Dzīvniekiem, kas nonāvēti 22. dienā pēc piedzimšanas vai agrāk, fiksāciju var veikt, vai nu iegremdējot šķīdumā vai veicot perfūziju. Dzīvniekiem, kas nonāvēti pētījuma beigās, jāveic fiksācija ar perfūziju. Audu paraugu sagatavošana visos aspektos, sākot ar dzīvnieku perfūziju un beidzot ar audu paraugu secēšanu, audu apstrādi un priekšmetstikliņu krāsošanu, ir jāplāno līdzsvaroti, lai katrā partijā būtu reprezentatīvi paraugi no katras devu grupas. Papildu norādījumi par neiropatoloģiju ir pieejami ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 20 (9), sk. arī (103).

Audu paraugu apstrāde

40. Ir jāreģistrē visas autopsijā konstatētās būtiskās anomālijas. Paņemtajiem audu paraugiem ir jābūt no visiem galvenajiem nervu sistēmas reģioniem. Audu paraugi ir jāsaglabā piemērotā fiksācijas šķīdumā un jāapstrādā saskaņā ar standartizētiem publicētiem histoloģijas protokoliem (69)(70)(71)(103). Iegremdēšana parafīnā ir pieļaujama CNS un PNS audiem, bet, ja ir vajadzīga labāka izšķirtspēja, papildus iegremdēšanai

▼M5

epoksīdsveķos pēc fiksācijas var būt lietderīgi izmantot osmiju (piemēram, perifērajiem nerviem, ja ir aizdomas par perifēro neiropātiju, un/vai veicot perifēro nervu morfometrisko analīzi). Morfometriskās analīzes nolūkā iegūtie smadzeņu audi jāiegremdē piemērotā līdzeklī visiem devu līmeņiem vienlaicīgi, lai nerastos sarukuma artefakti, kas var būt saistīts ar pārāk ilgu uzglabāšanu fiksācijas šķīdumā (6).

Neiropatoloģiskā izmeklēšana

41. Kvantitatīvās izmeklēšanas mērķi ir šādi:

i) noteikt nervu sistēmas rajonus, kur novērotas neiropatoloģiskas izmaiņas;

ii) noteikt, kāda veida neiropatoloģiskās izmaiņas izriet no testējamās ķīmiskās vielas iedarbības; un

iii) noteikt neiropatoloģisko izmaiņu smaguma pakāpi.

Reprezentatīvas histoloģiskas audu paraugu daļas attiecīgi apmācītam patologam ir mikroskopiski jāizmeklē attiecībā uz neiropatoloģisku izmaiņu liecībām. Visas neiropatoloģiskās izmaiņas ir subjektīvi jāiedala pēc smaguma pakāpes. Lai novērtētu smadzeņu daļas dzīvniekiem, kas humāni nonāvēti 22. dienā pēc piedzimšanas vai agrāk, var pietikt ar hematoksilīna un eozīna krāsvielu. Tomēr CNS un PNS audu daļām, kas iegūtas no dzīvniekiem, kuri ir nonāvēti pētījuma beigās, ieteicams izmantot mielīnu (piemēram, *luxol fast* zilais/*cresyl* violetais) un sudraba krāsvielu (piemēram, *Bielschowsky* vai *Bodians* krāsvielu). Ievērojot profesionāla patologa spriedumu un ņemot vērā novērotās izmaiņas, var uzskatīt, ka noteikta veida izmaiņu noteikšanai un raksturošanai ir lietderīgi izmantot citas krāsvielas, (piemēram, nervu audu šķiedru skābes proteīnu (*GFAP*) vai lecitīna histoķīmiju, lai novērtētu nervu audu un mikroskopisko nervu audu izmaiņas (72), fluoronefrītu, lai atklātu nekrozi (73)(74), vai sudraba krāsvielu, kas speciāli paredzēta nervu deģenerācijas konstatēšanai (75)).

42. Ir jāizdara morfometrisks (kvantitatīvs) izvērtējums, jo šādi dati var palīdzēt noteikt ar vielas ievadīšanu saistītu ietekmi, un tiem ir būtiska nozīme, interpretējot ar vielas ievadīšanu saistītas smadzeņu svara vai morfoloģijas atšķirības (76)(77). Nervu audu paraugi ir jāņem un jāsagatavo tā, lai varētu veikt morfometrisku izvērtējumu. Morfometriskais izvērtējums var aptvert, piemēram, noteiktu smadzeņu daļu lineāru vai reģionālu mērījumu (78). Lai varētu veikt lineāru vai reģionālu mērījumu, ir jāizmanto homologas daļas, kas rūpīgi izraudzītas pēc drošām mikroskopiskām atšķirībām (6). Lai noteiktu ar vielas ievadīšanu saistītu ietekmi uz tādiem parametriem kā daudzums vai šūnu skaits noteiktos neiroanatomiskos reģionos, var izmantot stereoloģiju (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Smadzenēs jāmeklē jebkādas liecības par neiropatoloģiskām izmaiņām, kas saistītas ar vielas ievadīšanu, un no visām galvenajām smadzeņu daļām (piemēram, ožas sīpols, smadzeņu pusložu garoza, hipokamps, bazālie gangliji, talāms, hipotalāms, vidussmadzenes (jumts, *tegmentum* un smadzeņu kājiņas), tilts, garenās smadzenes, smadzenītes) ir jāpaņem pietiekami paraugi, lai būtu iespējams veikt rūpīgu pārbaudi. Ir svarīgi visiem dzīvniekiem smadzeņu daļas ņemt vienā līmenī. Pieaugušiem dzīvniekiem, kas humāni nonāvēti pētījuma beigās, ir jāņem paraugi no attiecīgajām muguras smadzeņu un PNS daļām. Izmeklējamo vietu skaitā jāiekļauj acs ar acs nervu un tīkleni, muguras smadzenes pie kakla un muguras paresninājumiem, dorsālo un ventrālo saknīšu šķiedras, proksimālais sēžas nervs, proksimālais tibiālais nervs (pie ceļa) un tibiālā nerva apakšstilba muskuļa zari. Muguras smadzeņu un perifēro nervu griezumiem nepieciešams gan šķērsgriezums, gan garengriezums.

▼M5

44. Neiropatoloģiskajā izvērtējumā jāiekļauj arī nervu sistēmas attīstības traucējumu pazīmju pārbaude (6)(85)(86)(87)(88)(89), kā arī šūnu izmaiņas (piemēram, neironu vakuolizācija, deģenerācija, nekroze) un audu izmaiņas (piemēram, glioze, leikocītu infiltrācija, cistu veidošanās). Šajā sakarā ar vielas ievadīšanu saistītu ietekmi ir svarīgi nošķirt no normālas attīstības gadījumiem, kādi iespējami tajā attīstības stadijā, kādā dzīvnieks bijis nonāvēšanas brīdī (90). Būtisku izmaiņu piemēri, kas liecina par attīstības traucējumiem, ir (ne tikai) šādi:

— ožas sīpolu, smadzeņu vai smadzenīšu kopējā izmēra vai veida izmaiņas,

— dažādu smadzeņu daļu relatīvā izmēra izmaiņas, tostarp smadzeņu daļu izmēra palielināšanās vai samazināšanās, kas saistīta ar parasti pārejošu šūnu vai aksonu projekciju populāciju (piemēram, smadzenīšu ārējais ģeneratīvais slānis, lielais smadzeņu saiklis) zaudēšanu vai noturīgumu,

— savairošanās, migrācijas un diferenciācijas izmaiņas, uz ko norāda reģioni, kur konstatēta pārmērīga apoptoze vai nekroze, ektopisku, dezorientētu vai izkropļotu neironu klasteri vai izkliedētas populācijas vai smadzeņu garozas struktūru dažādu līmeņu relatīvā izmēra izmaiņas,

— mielinizācijas modeļu izmaiņas, tostarp kopējā izmēra samazināšanās vai mieliniēto struktūru iekrāsošanas izmaiņas,

— hidrocefālijas pazīmes, jo īpaši ventrikulu palielināšanās, smadzeņu kanāla stenoze un smadzeņu garozas biezuma samazināšanās.

Devas un atbildes reakcijas sakarības analīze attiecībā uz neiropatoloģiskajām pārmaiņām

45. Kvalitatīvu un kvantitatīvu neiropatoloģisku izmeklēšanu ieteicams izdarīt saskaņā ar turpmāk tekstā aprakstīto pakāpenisko procedūru. Vispirms griezumus no augstākās devas grupas salīdzina ar kontroles grupas griezumiem. Ja augstākās devas grupas dzīvniekiem neiropatoloģiskas izmaiņas netiek konstatētas, turpmāki izmeklējumi nav jāveic. Ja augstākās devas grupas dzīvniekiem konstatē neiropatoloģiskas izmaiņas, ir jāizmeklē vidēji lielās un mazās devas grupas dzīvnieki. Ja nāves vai citādu nevēlamu toksicitātes izpausmju dēļ augstākās devas grupa tiek likvidēta, izmeklējumi neiropatoloģisku izmaiņu noteikšanai ir jāveic augstākās un vidēji lielās devas grupās. Ja neirotoksicitātes pazīmes dzīvniekiem ir konstatētas mazāko devu grupās, neiropatoloģiskie izmeklējumi ir jāveic attiecīgajām grupām. Ja kvalitatīvas vai kvantitatīvas izmeklēšanas rezultātā tiek konstatētas kādas ar vielas ievadīšanu saistītas neiropatoloģiskas izmaiņas, izvērtējot visus dzīvniekus no visām devu grupām, ir jānosaka, kāda ir šo izmaiņu sastopamības un audu bojājumu vai morfometrisko izmaiņu biežuma un smaguma atkarība no devas. Šai izvērtēšanai jāaptver visas smadzeņu daļas, kurās konstatētas jebkādas neiropatoloģiskas izmaiņas. Attiecībā uz katru bojājuma veidu ir jāapraksta smaguma pakāpes noteikšanai izmantotās īpašības, arī īpatnības, kas izmantotas katras pakāpes diferencēšanai. Katra bojājuma veida biežums un smaguma pakāpe ir jādokumentē, un ir jāveic statistiskā analīze, lai novērtētu sakarību starp devu un atbildes reakciju. Ieteicams izmantot kodētus priekšmetstikliņus (91).

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

46. Par datiem veido atsevišķu pārskatu un tos apkopo tabulā, par katru testa grupu norādot izmaiņu veidu un to mātīšu, katra dzimuma pēcnācēju un metienu skaitu, kam attiecīgā izmaiņa konstatēta. Ja pēcnācēji pēc piedzimšanas tiek eksponēti tieši, ir jāreģistrē ekspozīcijas ceļš, ilgums un periods.

▼M5

Rezultātu izvērtēšana un interpretācija

47. Ontoģenēzes neirotoksicitātes pētījums sniedz informāciju par to, kāda ietekme ir atkārtotai eksponētībai ķīmiskajai vielai *in utero* un postnatālās attīstības sākumā. Tā kā tiek uzsvērti gan vispārīgās toksicitātes, gan ontoģenēzes neirotoksicitātes beigupunkti, pētījuma rezultāti dod iespēju tādu ietekmi uz neiroloģisko attīstību, kura sastopama bez vispārīgas maternālas toksicitātes, atšķirt no tādas ietekmes uz attīstību, kura izpaužas tikai pie līmeņiem, kas ir toksiski arī mātesdzīvniekam. Tā kā starp pētījuma plānu, statistisko analīzi un datu bioloģisko nozīmīgumu pastāv sarežģīta mijiedarbība, pienācīgai ontoģenēzes neirotoksicitātes datu interpretācijai ir nepieciešams ekspertu viedoklis (107)(109). Interpretējot testa rezultātus, ir jāizmanto zinātnisko datu nozīmīguma pieeja (20)(92)(93)(94). Ir jāizvērtē arī (sastopamie) uzvedības un morfoloģisko konstatējumu modeļi, kā arī liecības par sakarību starp devu un atbildes reakciju. Šajā raksturojumā ir jāiekļauj visu ontoģenēzes neirotoksicitātes novērtēšanā būtisko pētījumu dati, arī dati, kas iegūti epidemioloģiskos pētījumos vai atsevišķos gadījumos ar cilvēkiem un eksperimentālos pētījumos ar dzīvniekiem (piemēram, toksikokinētiskie dati, dati par struktūru un aktivitāti un dati no citiem toksicitātes pētījumiem). Tas attiecas arī uz sakarību starp testējamās ķīmiskās vielas devām un neirotoksisko iedarbību uz katru dzimumu vai tās neesamību, sastopamību un pakāpi (20)(95).

48. Izvērtējot datus, ir jākomentē to bioloģiskais un statistiskais nozīmīgums. Statistiskā analīze ir jāuzskata par rīku, kas vada, nevis nosaka rezultātu interpretāciju. Statistiskā nozīmīguma trūkums nedrīkst būt vienīgais pamatojums tam, lai secinātu, ka ar vielas ievadīšanu saistītas ietekmes nav, un statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais pamatojums secinājumam, ka pastāv ar vielas ievadīšanu saistīta ietekme. Lai izvairītos no iespējamiem maldīgi negatīviem konstatējumiem un no tipiskajām negatīva rezultāta pierādīšanas grūtībām, ir jāaplūko pieejamie pozitīvās un vēsturiskās kontroles dati, jo īpaši tad, ja ar vielas ievadīšanu saistītas ietekmes nav (102) (106). Maldīgi pozitīvu rezultātu varbūtība ir jāizskata, ņemot vērā datu kopējo statistisko novērtējumu (96). Izvērtējumā jānorāda sakarība starp konstatētajām neiropatoloģiskajām un uzvedības izmaiņām, ja tāda pastāv.

49. Visi rezultāti ir jāanalizē, izmantojot statistiskus modeļus, kas atbilst eksperimenta plānam (108). Parametriskās vai neparametriskās analīzes izvēle ir jāpamato, ņemot vērā tādus faktorus kā datu veids (transformētie vai netransformētie) un to sadalījums, kā arī izraudzītās statistiskās analīzes metodes relatīvais noturīgums. Statistiskās analīzes metode jāizvēlas, ņemot vērā pētījuma nolūku un plānu, lai mazinātu I tipa (maldīgi pozitīvs) un II tipa (maldīgi negatīvs) kļūdas (96)(97)(104)(105). Attīstības pētījumos, kuros izmanto tādas šķirnes, kurām vienā metienā ir vairāki pēcnācēji un tie tiek testēti, metiens ir jāiekļauj statistikas modelī, lai ierobežotu I tipa kļūdu skaita pieaugumu (98)(99)(100)(101). Statistiskajai mērvienībai ir jābūt metienam, nevis mazulim. Eksperimenti ir jāveido tā, lai viena metiena atsevišķie dzīvnieki nebūtu atsevišķu novērojumu objekti. Visi beigupunkti, kurus atkārtoti mēra vienam un tam pašam subjektam, ir jāanalizē ar tādiem statistiskiem modeļiem, kuros būtu ņemts vērā, ka minētie mērījumi nav neatkarīgi.

Testēšanas pārskats

50. Testēšanas pārskatā jāietver vismaz turpmāk minētā informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības,

— identifikācijas dati, tostarp avots,

▼M5

— preparāta tīrība un zināmie un/vai paredzamie piemaisījumi.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums, ja nesējviela nav ūdens vai fizioloģiskais šķīdums.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga un līnija un pamatojums, ja testējamā suga nav žurka,

— testa dzīvnieku piegādātājs,

— dzīvnieku skaits, vecums pētījuma sākumā un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība, ūdens u. c.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

— devu izvēles pamatojums,

— devas ievadīšanas ceļa un laika pamatojums,

— ievadīto devu specifikācija, iekļaujot sīkus datus par ievadītā materiāla nesējvielu, tilpumu un fizikālo formu,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— mātīšu un pēcnācēju unikālai identifikācijai izmantotā metode,

— sīks apraksts par kārtību, kā veic nejaušināto izlasi, lai sadalītu mātītes vielas ievadīšanas grupās, izlasītu liekos mazuļus likvidēšanai un tos iedalītu testa grupās,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu,

— testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas (milj. daļas) barībā/dzeramajā ūdenī vai ieelpotajā gaisā pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg no ķermeņa svara dienā)(attiecīgā gadījumā),

— telpas apstākļi,

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti (piemēram, ūdensvada ūdens vai destilēts ūdens),

— pētījuma sākuma un beigu datums.

Novērojumu un testa procedūras:

— sīks apraksts par procedūrām, ko izmanto, lai standartizētu novērojumus un procedūras, kā arī vērtēšanas novērojumos izmantotās darba definīcijas,

— visu izmantoto testa procedūru saraksts un to izmantošanas pamatojums,

— sīki uzvedības/funkcionālo, patoloģisko, neiroķīmisko vai elektrofizioloģisko procedūru dati, arī informācija un sīkas ziņas par automātiskajām ierīcēm,

— testēšanas procedūrās izmantotās kalibrēšanas, ierīču ekvivalences nodrošināšanas un vielas ievadīšanas grupu līdzsvarošanas procedūras,

— īss pamatojums visiem lēmumiem, kas saistīti ar profesionālu spriedumu.

▼**M5**

Rezultāti (atsevišķi un kopējie, attiecīgā gadījumā arī vidējā vērtība un dispersija):

— dzīvnieku skaits pētījuma sākumā un beigās,

— to dzīvnieku un metienu skaits, ko izmanto katrai testēšanas metodei,

— katra dzīvnieka identifikācijas numurs un metiens, pie kura pieder attiecīgais dzīvnieks,

— metiena lielums un vidējais svars dzimšanas brīdī, pēc dzimuma,

— ķermeņa svars un ķermeņa svara izmaiņu dati, tostarp mātīšu un pēcnācēju ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,

— barības patēriņa dati un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņa dati (piemēram, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar ūdeni),

— dati par toksisko atbildes reakciju pa dzimumiem un devu līmeņiem, arī toksicitātes pazīmes vai mirstība, tostarp attiecīgā gadījumā nāves iestāšanās brīdis un cēlonis,

— detalizētos klīniskos novērojumos konstatētas ietekmes veids, smagums un ilgums, sākšanās diena, laiks un tālākā attīstība,

— visu attīstības parametru (svars, dzimumbriedums un uzvedības ontoģenēze) rādītāji katrā novērošanas reizē,

— sīks apraksts par visiem uzvedības, funkcionāliem, neiropatoloģiskiem, neiroķīmiskiem un elektrofizioloģiskiem konstatējumiem pa dzimumiem, arī palielinājums un samazinājums salīdzinājumā ar kontroldzīvniekiem,

— autopsijas atrades,

— smadzeņu svars,

— diagnozes, kas secinātas no neiroloģiskām pazīmēm un bojājumiem, arī dabiski sastopamas slimības vai stāvokļi,

— atražu paraugu attēli,

— mazjaudas attēli, ar kuriem var novērtēt morfometrijai izmantoto daļu homoloģiju,

— dati par uzsūkšanos un metabolismu, arī papildu dati no atsevišķa toksikokinētikas pētījuma, ja tādi ir,

— rezultātu statistiskā apstrāde, arī datu analīzē izmantotie statistiskie modeļi, un rezultāti neatkarīgi no to būtiskuma,

— pētījumā iesaistīto personu saraksts, arī profesionālā sagatavotība.

Rezultātu izvērtējums:

— informācija par atbildes reakciju uz devu pa dzimumiem un grupām,

— jebkādas citas toksiskas ietekmes sakarība ar secinājumu par testējamās ķīmiskās vielas neirotoksisko potenciālu pa dzimumiem un grupām,

— jebkādas ar toksikokinētiku saistītas informācijas ietekme uz secinājumiem,

— līdzība ar zināmu neirotoksisku vielu ietekmi,

▼M5

— dati, kas apliecina testēšanas metodes ticamību un jutību (t. i., pozitīvās kontroles dati un vēsturiskie kontroldati),

— vai pastāv korelācija starp neiropatoloģisko un funkcionālo ietekmi,

— *NOAEL* vai etalondeva mātītēm un pēcnācējiem pa dzimumiem un grupām.

Secinājumi:

— datu vispārējās interpretācijas izvērtēšana, balstoties uz rezultātiem, arī secinājums par to, vai testējamā ķīmiskā viela izraisījusi ontoģenēzes neirotoksicitāti un kāds bijis *NOAEL*.

LITERATŪRA

(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. Available: [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. Available: [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 Available: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&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. Available: [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) Šā pielikuma B.34. nodaļa "Toksicitātes ietekme uz vienas paaudzes reproduktīvo funkciju".

(15) Šā pielikuma B.35. nodaļa "Divu paaudžu reproduktīvās toksicitātes pētījums".

(16) Šā pielikuma B.43. nodaļa "Žurku neirotoksicitātes pētījums".

(17) Šā pielikuma B.31. nodaļa "Prenatālās ontoģenēzes toksicitātes pētījums".

(18) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.

(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. Available: [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. Available: [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. 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. 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. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). 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. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, 67. – 100. lpp.

(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, 37. – 82. lpp.

(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. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, 287. – 351. lpp.

(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, 181. – 211. lpp.

▼**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. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. 125. – 145. lpp.

(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, 84. – 107. lpp.

(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. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, 3. – 41. lpp.

(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-0644A.

(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**

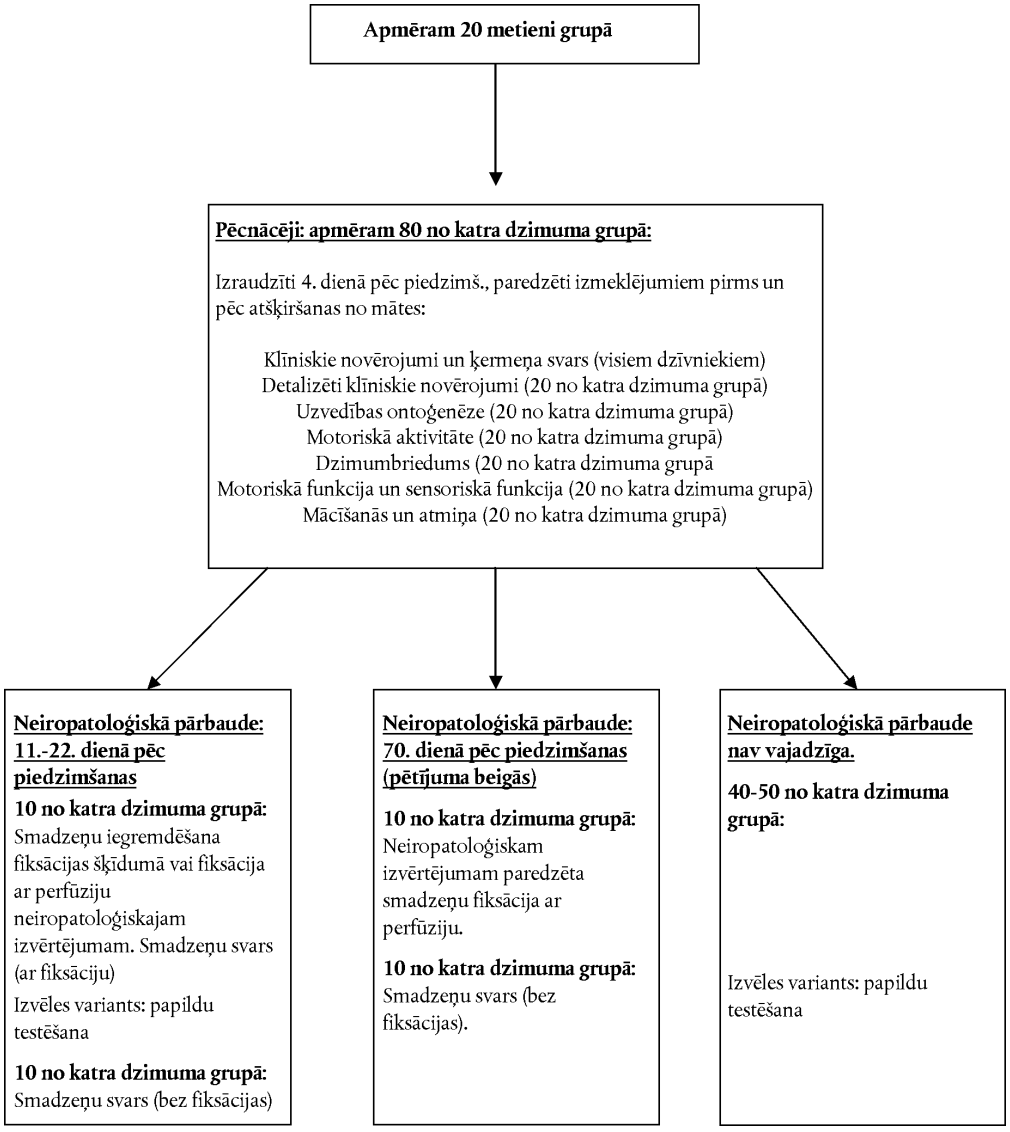
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology 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

1. attēls

Vispārīga testēšanas shēma, ko izmanto funkcionālajiem/uzvedības testiem, neiropatoloģiskajai izvērtēšanai un smadzeņu svara noteikšanai. Šī diagramma ir saskaņā ar 13.–15. punkta aprakstu (PND = diena pēc piedzimšanas). 1. papildinājumā ir minēti dzīvnieku iedalījuma piemēri.



▼M5

1. papildinājums

51. Iespējamā sadalījuma piemēri ir aprakstīti turpmāk tekstā un apkopoti tabulā. Šie piemēri ir sniegti, lai parādītu, ka pētījuma dzīvniekus atbilstoši dažādām testēšanas paradigmām var iedalīt grupās dažādos veidos.

1. piemērs

52. Vienu grupu ar 20 mazuļiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto uzvedības ontoģenēzes pārbaudei pirms dzīvnieka atšķiršanas no mātes. No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) humāni nonāvē 22. dienā pēc piedzimšanas. Smadzenes izgriež, nosver un apstrādā histopatoloģiskai izvērtēšanai. Turklāt ievāc datus par smadzeņu svaru, izmantojot smadzenes (bez fiksācijas) no pārējiem 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā devas līmeņa grupā.

53. Citu grupu ar 20 dzīvniekiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto funkcionālā/uzvedības testā pēc dzīvnieka atšķiršanas no mātes (detalizēti klīniskie novērojumi, motoriskā aktivitāte, reakcijas uz dzirdes kairinātājiem un kognitīvās funkcijas pārbaude pusaugu dzīvniekiem) un dzimumbrieduma vecuma novērtēšanā. No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) pētījuma beigās (apmēram 70. dienā pēc piedzimšanas) iemidzina ar anestēziju un veic fiksāciju ar perfūziju. Pēc papildu fiksācijas *in situ* smadzenes izgriež un apstrādā neiropatoloģiskai izvērtēšanai.

54. Lai pārbaudītu kognitīvās funkcijas jauniem pieaugušiem dzīvniekiem (piemēram, 60.–70. dienā pēc piedzimšanas), izmanto trešo grupu ar 20 mazuļiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena). No minētajiem dzīvniekiem 10 dzīvniekus no katra dzimuma uz devas līmeni (1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) pētījuma beigās nonāvē, un izgriež un nosver smadzenes.

55. Pārējos 20 dzīvniekus no katra dzimuma grupā saglabā iespējamām papildu pārbaudēm.

1. tabula

Mazuļa Nr. ([a])		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/tests
T	M		
1	5	20 t + 20 m	Uzvedības ontoģenēze
		10 t + 10 m	22. dienā pēc piedzimšanas nosver smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju
		10 t + 10 m	22. dienā pēc piedzimšanas nosver smadzenes
2	6	20 t + 20 m	Detalizēti klīniskie novērojumi
		20 t + 20 m	Motoriskā aktivitāte
		20 t + 20 m	Dzimumbriedums
		20 t + 20 m	Motoriskās un sensoriskās funkcijas
		20 t + 20 m	Mācīšanās un atmiņa (25. diena pēc piedzimšanas)
		10 t + 10 m	Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju ~ 70. dienā pēc piedzimšanas

▼**M5**

Mazuļa Nr. [a]		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/tests
T	M		
3	7	20 t + 20 m	Mācīšanās un atmiņa (jauniem pieaugušiem dzīvniekiem)
		10 t + 10 m	Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes ~ 70. dienā pēc piedzimšanas
4	8	—	Saglabā dzīvniekus aizstāšanai vai papildu pārbaudēm

[a] Šajā piemērā liekie dzīvnieki ir likvidēti, metienā atstājot 4 tēviņus + 4 mātītes; tēviņus numurē no 1 līdz 4, bet – no 5 līdz 8.

2. piemērs

56. Vienu grupu ar 20 mazuļiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto uzvedības ontoģenēzes pārbaudei pirms dzīvnieka atšķiršanas no mātes. No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) humāni nonāvē 11. dienā pēc piedzimšanas. Smadzenes izgriež, nosver un apstrādā histopatoloģiskai izvērtēšanai.

57. Citu grupu ar 20 dzīvniekiem no katra dzimuma uz devas līmeni (1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto, lai veiktu pārbaudes pēc dzīvnieka atšķiršanas no mātes (detalizēti klīniskie novērojumi, motoriskā aktivitāte, dzimumbrieduma vecuma novērtējums un motoriskās un sensoriskās funkcijas). No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) pētījuma beigās (apmēram 70. dienā pēc piedzimšanas) iemidzina ar anestēziju un veic fiksāciju, izmantojot perfūziju. Pēc papildu fiksācijas *in situ* smadzenes izgriež, nosver un apstrādā neiropatoloģiskai izvērtēšanai.

58. Lai pieaugušiem un jauniem pieaugušiem dzīvniekiem pārbaudītu kognitīvās funkcijas, izmanto 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena). Kognitīvās funkcijas pārbaudēm 23. dienā pēc piedzimšanas un pārbaudēm ar jauniem pieaugušiem dzīvniekiem izmanto dažādus dzīvniekus. Pētījuma beigās pieaugušos testētos 10 dzīvniekus no katra dzimuma grupā nonāvē, izgriež un nosver smadzenes.

59. Tos pārējos 20 dzīvniekus no katra dzimuma uz grupu, ko testam neizraugās, nonāvē un likvidē pēc atšķiršanas no mātes.

2. tabula

Mazuļa Nr. [a]		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/tests
T	M		
1	5	20 t + 20 m	Uzvedības ontoģenēze
		10 t + 10 m	11. dienā pēc piedzimšanas nosver smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju
2	6	20 t + 20 m	Detalizēti klīniskie novērojumi
		20 t + 20 m	Motoriskā aktivitāte
		20 t + 20 m	Dzimumbriedums
		20 t + 20 m	Motoriskās un sensoriskās funkcijas
		10 t + 10 m	Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju ~ 70. dienā pēc piedzimšanas

▼M5

Mazuļa Nr. (a)		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/tests
T	M		
3	7	10 t + 10 m (b)	Mācīšanās un atmiņa (23. diena pēc piedzimšanas)
3	7	10 t + 10 m (b)	Mācīšanās un atmiņa (jauniem pieaugušiem dzīvniekiem) Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes
4	8	—	Dzīvniekus nonāvē un likvidē 21. dienā pēc piedzimšanas.

(a) Šajā piemērā liekie dzīvnieki ir likvidēti, atstājot 4 tēviņus + 4 mātītes; tēviņus numurē no 1 līdz 4, bet mātītes – no 5 līdz 8.

(b) Kognitīvās funkcijas pārbaudēm 23. dienā pēc piedzimšanas un pārbaudēm ar jauniem pieaugušajiem dzīvniekiem izmanto dažādus mazuļus (piemēram, pāra/nepāra skaitļa metienus, no pavisam 20 metieniem).

3. piemērs

60. Vienu grupu ar 20 mazuļiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto smadzeņu svara noteikšanai un neiropatoloģiskai novērtēšanai 11. dienā pēc piedzimšanas. No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) humāni nonāvē 11. dienā pēc piedzimšanas, un smadzenes izgriež, nosver un apstrādā, lai varētu veikt histopatoloģisko izvērtēšanu. Turklāt smadzeņu svara datus iegūst, bez fiksācijas izmantojot smadzenes, kas ņemtas no pārējiem 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā devas līmeņa grupā.

61. Citu grupu ar 20 dzīvniekiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto uzvedības ontoģenēzes pārbaudei (motoriskā aktivitāte), testiem pēc dzīvnieka atšķiršanas no mātes (motoriskā aktivitāte, dzimumbrieduma vecuma novērtējums) un pieaugušu dzīvnieku kognitīvo funkciju pārbaudei.

62. Citu grupu ar 20 dzīvniekiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto motorisko un sensorisko funkciju pārbaudēm (reakcija uz dzirdes kairinātājiem) un detalizētiem klīniskajiem novērojumiem. No minētajiem dzīvniekiem 10 mazuļus no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) ar anestēziju iemidzina un veic fiksāciju, pētījuma beigās izmantojot perfūziju (apmēram 70. dienā pēc piedzimšanas). Pēc papildu fiksācijas *in situ* smadzenes izgriež, nosver un apstrādā neiropatoloģiskai izvērtēšanai.

63. Citu grupu ar 20 mazuļiem no katra dzimuma uz devas līmeni (t. i., 1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) izmanto jaunu pieaugušu dzīvnieku kognitīvās funkcijas pārbaudēm. No minētajiem dzīvniekiem 10 dzīvniekus no katra dzimuma grupā (1 tēviņu un 1 mātīti no katra metiena) pētījuma beigās nonāvē un izgriež un nosver smadzenes.

3. tabula

Mazuļa Nr. (a)		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/pārbaude
T	M		
1	5	10 t + 10 m	11. dienā pēc piedzimšanas nosver smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju
		10 t + 10 m	11. dienā pēc piedzimšanas nosver smadzenes
2	6	20 t + 20 m	Uzvedības ontoģenēze (motoriskā aktivitāte)
		20 t + 20 m	Motoriskā aktivitāte
		20 t + 20 m	Dzimumbriedums
		20 t + 20 m	Mācīšanās un atmiņa (27. diena pēc piedzimšanas)

▼**M5**

Mazuļa Nr. [a]		Pārbaudei iedalīto mazuļu skaits	Izmeklēšana/pārbaude
T	M		
3	7	20 t + 20 m	Reakcija uz dzirdes kairinātājiem (pusaudžiem un jauniem pieaugušiem dzīvniekiem)
		20 t + 20 m	Detalizēti klīniskie novērojumi
		10 t + 10 m	Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes/pārbauda neiropatoloģiju/morfometriju ~ 70. dienā pēc piedzimšanas
4	8	20 t + 20 m	Mācīšanās un atmiņa (jauniem pieaugušiem dzīvniekiem)
		10 t + 10 m	Nosver jauno pieaugušo dzīvnieku smadzenes

[a] Šajā piemērā liekie dzīvnieki ir likvidēti, metienā atstājot 4 tēviņus + 4 mātītes; tēviņus numurē no 1 līdz 4, bet mātītes – no 5 līdz 8.

▼**M5**

2. papildinājums

Definīcijas

Ķīmiskā viela: viela vai maisījums.

Testējamā ķīmiskā viela: jebkura viela vai maisījums, ko pārbauda, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M5

B.54. **UTEROTROPAIS BIOTESTS AR GRAUZĒJIEM: ESTROGĒNO ĪPAŠĪBU ĪSĀ SKRĪNINGA TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 440 (2007. gads). ESAO 1998. gadā sāka augsti prioritāru darbību, lai par iespējami endokrīnās sistēmas darbības traucējumus izraisošu vielu skrīningu un pārbaudēm pārskatītu esošos norādījumus un izveidotu jaunus (1). Viens no apakšpasākumiem bija izveidot testēšanas norādījumus "Uterotropajam biotestam ar grauzējiem". "Uterotropajam biotestam ar grauzējiem" veica vērienīgu validācijas programmu, arī sagatavoja detalizētu pamatinformāciju (2)(3) un īstenoja vērienīgus laboratoriju un starplaboratoriju pētījumus, lai pierādītu biotesta piemērotību un reproducējamību ar spēcīgu estrogēnu standartvielu, vājiem estrogēna receptoru agonistiem, spēcīgu estrogēna receptoru antagonistu un negatīvu ķīmisko standartvielu (4)(5)(6)(7)(8)(9). Šī testēšanas metode B.54 ir radīta, izmantojot testēšanas programmā gūto pieredzi un šīs programmas rezultātus, kas gūti ar estrogēnu agonistiem.

2. Uterotropais biotests ir īss skrīninga tests, kas tika izstrādāts 20. gs. 30. gados (27)(28) un ko ekspertu komiteja pirmo reizi standartizēja skrīningam 1962. gadā (32)(35). Tās pamatā ir dzemdes svara pieaugums vai uterotropa atbildes reakcija (recenziju sk. 29. punktā). Ar to novērtē ķīmiskās vielas spēju izraisīt dabiskā estrogēna agonistiem vai antagonistiem (piemēram, 17 ß estradiols) pielīdzināmu bioloģisko aktivitāti, tomēr antagonistu noteikšanai to izmanto daudz retāk nekā agonistu noteikšanai. Dzemde uz estrogēnu reaģē divos veidos. Sākotnējā reakcija ir tās svara pieaugums, kas saistīts ar ūdens uzsūkšanos. Pēc tam svara pieaugums ir saistīts ar audu augšanu (30). Žurku un peļu dzemdes reakcijas ir kvalitatīvi salīdzināmas.

3. Biotestu izmanto kā *in vivo* skrīninga testu, un tas būtu jāskata kopā ar "ESAO konceptuālo pamatdokumentu: endokrīnās sistēmas darbības traucējumus izraisošu vielu testēšana un novērtēšana" (2. papildinājums). Minētajā konceptuālajā regulējumā uterotropais biotests ir iekļauts 3. līmenī kā *in vivo* tests, kas sniedz informāciju par vienu atsevišķu endokrīnās sistēmas mehānismu, t. i., estrogenitāti.

4. Uterotropo biotestu ir paredzēts iekļaut *in vitro* un *in vivo* testu sērijā, kuros identificē ķīmiskās vielas, kas var ietekmēt endokrīnās sistēmas darbību, un ar kuru palīdzību var novērtēt riskus cilvēku veselībai un videi. Lai novērtētu testa veiktspēju estrogēnisku ķīmisko vielu identificēšanā, ESAO validācijas programmā tika izmantoti gan stipri, gan vāji estrogēnu agonisti (4)(5)(6)(7)(8). Šādi tika labi pierādīta testa procedūras jutība attiecībā uz estrogēnu agonistiem, kā arī laboratorijas un starplaboratoriju pētījumu reproducējamība.

5. Attiecībā uz negatīvām ķīmiskām vielām validācijas programmā iekļāva tikai vienu "negatīvu" ķīmisko standartvielu, kura uterotropā biotestā, kā arī *in vitro* receptoru saistīšanās testā un receptoru testā jau atzīta par negatīvu, bet ir izvērtēti ar ESAO validācijas programmu nesaistīti papildu testa dati, ar kuriem papildus pamatots uterotropā biotesta specifiskums estrogēnu agonistu skrīningā (16).

▼**M5**

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

6. Estrogēnu agonisti un antagonisti darbojas kā estrogēna α un β receptoru ligandi, un tie var attiecīgi aktivizēt vai nomākt receptoru transkripciju. Tas var radīt veselības apdraudējumus, tostarp negatīvi ietekmēt reprodukciju un attīstību. Tāpēc ir nepieciešams ķīmiskas vielas ātri novērtēt un izvērtēt kā iespējamus estrogēna agonistus vai antagonistus. Kāda liganda afinitātei ar kādu estrogēna receptoru vai tam, ka *in vitro* aktivizējas ziņotājgēnu transkripcija, ir informatīva nozīme, tomēr tas ir tikai viens no faktoriem, kas nosaka iespējamu bīstamību. Bīstamību var noteikt arī, piemēram, metaboliska aktivēšanās un dezaktivēšanās, vielai iekļūstot ķermenī, tās izplatīšanās mērķaudos un izdalīšanās no organisma, – tas vismaz daļēji atkarīgs no ievadīšanas ceļa un testējamās ķīmiskās vielas. Tas nozīmē, ka testējamās ķīmiskās vielas iespējamā darbība piemērotos apstākļos ir jāpārbauda *in vivo*, izņemot gadījumus, kad ķīmiskās vielas īpašības attiecībā uz uzsūkšanos – izplatīšanos – metabolismu – izdalīšanos attiecīgu informāciju jau nodrošina. Dzemdes audi ātri un spēcīgi aug, ja tos stimulē ar estrogēnu, jo īpaši laboratoriju grauzējiem, kuru estrālais cikls ir apmēram 4 dienas. Grauzēju sugas, jo īpaši žurkas, bieži izmanto arī toksicitātes pētījumos bīstamības raksturošanai. Tāpēc grauzēju dzemde ir atbilstošs mērķorgāns estrogēna agonistu un antagonistu *in vivo* skrīningam.

7. Šīs testēšanas metodes pamatā ir ESAO validācijas pētījumā izmantotie protokoli, par kuriem laboratoriju un starplaboratoriju pētījumos apstiprināts, ka tie ir uzticami un atkārtojami (5)(7). Pašlaik ir pieejamas divas metodes, proti, metode, kurā izmanto pieaugušas mātītes, kam ir izoperētas olnīcas, un metode, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, kam olnīcas nav izoperētas. ESAO validācijas testa programma apliecināja, ka abu minēto metožu jutība un reproducējamība ir salīdzināma. Metode ar nenobriedušiem dzīvniekiem gan ir nespecifiskāka sakarā ar to, ka šādiem dzīvniekiem nedarbojas hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass, bet salīdzinājumā ar metodi, kurā izmanto pieaugušas mātītes, kurām ir izoperētas olnīcas, tai ir lielāks pētījuma tvērums, jo ar šo metodi var konstatēt ķīmiskas vielas, kas iedarbojas uz hipotalāma, hipofīzes un gonādu asi, nevis tikai uz estrogēna receptoru. Žurkas hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass darbojas apmēram no 15 dienu vecuma. Pirms tam pubertāti, piemēram, ar *GnRH*, paātrināt nevar. Mātītēm, kas gandrīz sasniegušas pubertātes vecumu, pirms maksts atvēršanās ir vairāki klusie periodi, kuru rezultātā nenotiek maksts atvēršanās vai ovulācija, bet notiek hormonu svārstības. Ja ķīmiskā viela tieši vai netieši stimulē hipotalāma, hipofīzes un gonādu asi, tas var izraisīt agrīnu pubertātes iestāšanos, agrīnu ovulāciju un paātrinātu maksts atvēršanos. Augšanu stimulē un maksts atvēršanos paātrina ne vien ķīmiskas vielas, kas iedarbojas uz hipotalāma, hipofīzes un gonādu asi, bet arī tāda barība, kas gan nav estrogēniska, taču ir ar augstāku metabolizējamas enerģijas līmeni. Minētās ķīmiskās vielas neizraisīs uterotropo atbildes reakciju mātītēm, kurām ir izoperētas olnīcas, jo šo dzīvnieku hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass nedarbojas.

8. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ priekšroka jādod metodei, kurā izmanto nenobriedušas žurkas, lai dzīvniekiem pirms tam netiktu veiktas operācijas un lai mazinātu dzīvnieku neizmantojamību, piemēram, attiecībā uz dzīvniekiem, kam ir estrālā cikla sākšanās pazīmes (sk. 30. punktu).

▼**M5**

9. Uterotropās atbildes reakcijas cilme nav tikai estrogēniska, proti, reakciju var izraisīt arī ķīmiskās vielas, kas nav estrogēnu agonisti vai antagonisti. Piemēram, relatīvi liela progesterona, testosterona vai dažādu sintētisko progestīnu deva arī var radīt stimulētu atbildes reakciju (30). Ja konstatēta atbildes reakcija, var veikt histoloģiskus izmeklējumus attiecībā uz maksts keratinizāciju un pārragošanos (30). Neatkarīgi no atbildes reakcijas iespējamā cēloņa, uterotropajā biotestā gūstot pozitīvu rezultātu, parasti jārīkojas, lai iegūtu precīzāku informāciju. Papildu liecības par estrogenitāti var iegūt *in vitro* testēšanā, piemēram, estrogēna receptora saistīšanās testos un transkripcijas aktivizēšanās testos, vai citos *in vivo* testos, piemēram, mātīšu pubertātes testā.

10. Tā kā uterotropo biotestu izmanto par *in vivo* skrīninga testu, izraudzītajā validācijas pieejā ir gan ņemti vērā dzīvnieku labturības apsvērumi, gan izmantota diferencētas testēšanas stratēģiju. Šajā sakarā centieni bija vērsti uz to, lai stingri apstiprinātu reproducējamību un jutību attiecībā uz estrogenitāti – kas ir galvenā problēma daudzu ķīmisko vielu gadījumā, –, bet maz tika darīts attiecībā uz testa daļu, kas skar antiestrogenitāti. Tā kā vielu ar izteikti antiestrogēniskām īpašībām (ko neaizēno kaut kāda estrogēniska darbība) ir ļoti maz, testēšanā tika izmantots tikai viena izteikti antiestrogēniska viela. Tāpēc šajā testēšanas metodē ir aplūkots estrogenitātes protokols, bet protokols, kurā ir aprakstīts antagonista tests, ir iekļauts Norādījumu dokumentā (37). Izteikti antiestrogēniskas darbības ķīmiskajām vielām paredzētā testa reproducējamību un jutību skaidrāk definēs vēlāk, kad testa procedūra jau kādu laiku būs izmantota un kad būs identificēts vairāk ķīmisko vielu ar šādu iedarbības veidu.

11. Ir atzīts, ka visām procedūrām, kas saistītas ar dzīvniekiem, ir jāatbilst vietējiem dzīvnieku labturības standartiem; turpmāk tekstā minētie labturības un apiešanās nosacījumi ir minimālie standarti, un lielāks spēks ir vietējam regulējumam, piemēram, Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvai 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (38). ESAO ir izdevusi arī citus noteikumus par humānu izturēšanos pret dzīvniekiem (25).

12. Tāpat kā visos testos, kur izmanto dzīvus dzīvniekus, ir ļoti svarīgi pirms testa sākuma pārliecināties, ka attiecīgie dati ir tiešām vajadzīgi. Piemēram, divi gadījumi, kur minētie dati var būt vajadzīgi, ir šādi:

— augsta ekspozīcijas iespējamība (konceptuālā regulējuma 1. līmenis, 2. papildinājums) vai estrogenitātes pazīmes (2. līmenis), – lai noskaidrotu, vai šāda ietekme ir iespējama *in vivo*,

— ietekme, kas liecina par estrogenitāti 4. vai 5. līmeņa *in vivo* testos, – lai pamatotu, ka attiecīgā ietekme ir saistīta ar estrogenitātes mehānismu, ko nevar noskaidrot *in vitro* testā.

13. Šajā testēšanas metodē minētās definīcijas ir minētas 1. papildinājumā.

▼**M5**

TESTA PRINCIPS

14. Uterotropā biotesta jutība tiek nodrošināta dzīvnieku testēšanas sistēmā, kurā nedarbojas hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass, un attiecīgi ir zems endogēnais cirkulējošā estrogēna līmenis. Tādā gadījumā ir zems dzemdes svara izejlielums un reakcija uz estrogēna ievadīšanu notiek maksimālā diapazonā. Grauzēju mātītēm minētajām prasībām atbilst divi estrogēnjutīgi stāvokļi:

i) nenobriedušas mātītes pēc atšķiršanas un pirms pubertātes, un

ii) jaunas pieaugušās mātītes, kurām izoperētas olnīcas un nodrošināts pietiekams laiks, lai varētu samazināties dzemdes audu apjoms.

15. Testējamo ķīmisko vielu ievada katru dienu ar mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju. Testējamo ķīmisko vielu pakāpeniskās devās saņem ne mazāk kā divas eksperimenta dzīvnieku grupas (norādījumus sk. 33. punktā), katrai grupai izmantojot vienu devas līmeni un ievadot vielu trīs dienas pēc kārtas, ja izvēlēta metode, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, un ievadot vielu vismaz trīs dienas pēc kārtas, ja izvēlēta metode, kurā izmanto pieaugušas mātītes, kam izoperētas olnīcas. Dzīvniekiem izdara autopsiju apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas. Estrogēna agonistu gadījumā novērtē vidējo dzemdes svaru grupās, kurās dzīvnieki saņem testējamo ķīmisko vielu, salīdzinājumā ar nesējvielas grupu, lai konstatētu, vai vērojams statistiski nozīmīgs pieaugums. Testa grupas dzīvnieku vidējā dzemdes svara statistiski nozīmīgs pieaugums liecina par pozitīvu atbildes reakciju šajā biotestā.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

16. Var izmantot parastās laboratorijas grauzēju līnijas. Piemēram, validācijas procesā tika izmantotas *Sprague* un *Dawley* un *Wistar* līnijas žurkas. Neizmanto līnijas, par kurām ir zināms vai par kurām ir aizdomas, ka to dzemde mazāk reaģē uz testējamo ķīmisko vielu. Laboratorijai ir jāpierāda izmantotās līnijas jutība, kā norādīts 26. un 27. punktā.

17. Žurkas un peles uterotropajā biotestā izmanto kopš 20. gs 30. gadiem. ESAO validācijas pētījumi tika veikti tikai ar žurkām, pieņemot, ka ir sagaidāms, ka abas sugas būs līdzvērtīgas, un tāpēc metodes validācijai pasaulē jāpietiek ar vienu sugu, lai taupītu resursus un aizsargātu dzīvniekus. Parasti reproduktīvās un ontoģenēzes toksicitātes pētījumos izmanto žurkas. Tā kā par pelēm ir ievērojama vēsturisko datu bāze, lai uterotropā biotesta metodes tvērumu attiecībā uz grauzējiem paplašinātu un par testa sugu izmantotu arī peles, ar tām ierobežotā apjomā tika veikts validācijas pēcpētījums (16). Saskaņā ar sākotnējo nolūku taupīt resursus un aizsargāt dzīvniekus ir izraudzīta pieeja, kura balstās uz vielu salīdzināmību, kurā testējamās ķīmiskās vielas un iesaistītās laboratorijas izmanto ierobežotā skaitā un arī nepārbauda kodētus paraugus. Šis validācijas pētījums, kurā izmanto vielu salīdzināmības pieeju, attiecībā uz uterotropo biotestu ar jaunām pieaugušām pelēm, kurām ir izoperētas olnīcas, apliecina, ka iegūtie kvalitatīvie un kvantitatīvie dati par žurkām un pelēm ir līdzīgi. Ja uterotropā biotesta rezultātus izmanto kā ilgtermiņa pētījuma priekšpētījumu, abos pētījumos var izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus. Vielu salīdzināmības pieeja tika izmantota tikai ar pelēm, kurām ir izoperētas olnīcas, un ziņojums nenodrošina tādu uzticamu datu kopumu, ar kuriem būtu iespējams validēt metodi, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, un tāpēc metode, kur izmanto nenobriedušas peles, nav šīs testēšanas metodes tvērumā.

▼M5

18. Tātad dažos gadījumos žurku vietā var izmantot peles. Ir jāpamato attiecīgās sugas izmantošana, ņemot vērā toksikoloģiskos, farmakokinētiskos un/vai citus kritērijus. Izmantojot peles, var būt jāmaina protokols. Piemēram, peles proporcionāli ķermeņa svaram patērē vairāk barības nekā žurkas, un tāpēc peļu barībā fitoestrogēnu saturam ir jābūt mazākam nekā žurku barībā (9)(20)(22).

Turēšanas un barošanas apstākļi

19. Visām procedūrām ir jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Minētie labturības un apiešanās nosacījumi ir minimālie standarti, un lielāks spēks ir vietējiem noteikumiem, piemēram, Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvai 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (38). Eksperimenta dzīvnieku telpas temperatūrai jābūt 22 °C (ar nobīdi ± 3 °C). Gaisa relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, ieteicams, ne vairāk kā 70 %, izņemot uzkopšanas laiku. Vēlamais gaisa relatīvais mitrums ir 50–60 %. Telpās ir jābūt mākslīgajam apgaismojumam. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā.

20. Laboratorijas dzīvnieku barību un dzeramo ūdeni dzīvnieki saņem *ad libitum*. Jaunus pieaugušos dzīvniekus var turēt atsevišķi vai būros grupās līdz trīs dzīvniekiem katrā būrī. Tā kā nenobriedušie dzīvnieki ir jauni, ieteicams tos turēt, veidojot sociālās grupas.

21. Ir zināms, ka augsts fitoestrogēnu līmenis laboratorijas dzīvnieku barībā veicina dzemdes svara pieaugumu tādā apmērā, kas ir pietiekams, lai interferētu ar uterotropo biotestu (13)(14)(15). Augsts fitoestrogēnu un metabolizējamās enerģijas līmenis laboratorijas dzīvnieku barībā var izraisīt arī agrīnu pubertātes iestāšanos nenobriedušiem dzīvniekiem. Fitoestrogēnu klātbūtni galvenokārt veicina sojas un sējas lucernas izstrādājumu iekļaušana laboratorijas dzīvnieku barībā, un fitoestrogēna koncentrācija dažādās laboratorijas dzīvnieku barības partijās ir atšķirīga (23). Ķermeņa svars ir svarīgs mainīgais, jo patērētās barības daudzums ir saistīts ar ķermeņa svaru. Tāpēc ar vienu un to pašu barību faktiskais patērētais fitoestrogēna daudzums dažādām sugām un dažādiem vecumiem var atšķirties (9). Nenobriedušas žurku mātītes attiecībā pret ķermeņa svaru var patērēt apmēram divreiz vairāk barības nekā jaunas pieaugušas žurku mātītes, kurām ir izoperētas olnīcas. Jaunas pieaugušas peles attiecībā pret ķermeņa svaru var patērēt apmēram četras reizes vairāk barības nekā jaunas pieaugušas žurku mātītes, kurām ir izoperētas olnīcas.

22. Tomēr uterotropā biotesta rezultāti (9)(17)(18)(19) liecina, ka ierobežotā daudzumā fitoestrogēni barībā ir pieņemami, un tas nemazina biotesta jutību. Var vadīties no tā, ka nenobriedušām *Sprague* un *Dawley* un *Wistar* sugas žurku mātītēm fitoestrogēnu līmenis barībā nedrīkst pārsniegt 350 µg genisteīna aizstājēju uz gramu laboratorijas dzīvnieku barības (6)(9). Šāda barība būtu piemērota, arī testējot jaunas pieaugušas žurkas, kam ir izoperētas olnīcas, jo jaunas pieaugušas žurkas attiecībā pret ķermeņa svaru patērē mazāk barības nekā nenobriedušas žurkas. Ja izmanto pieaugušas peles, kurām ir izoperētas olnīcas, vai žurkas, kuras ir jutīgākas pret fitoestrogēnu, fitoestrogēna daudzums barībā ir attiecīgi jāsamazina (20). Turklāt atšķirīgs metaboliskās enerģijas līmenis barībā var izraisīt pubertātes sākuma laika nobīdi (21)(22).

▼M5

23. Pirms pētījuma sākšanas ir rūpīgi jāizvēlas barība, lai fitoestrogēna (norādījumus sk. (6)(9)) vai metabolizējamās enerģijas līmenis nebūtu pārāk augsts, jo tas var nelabvēlīgi ietekmēt pētījuma rezultātus (15)(17)(19)(22)(36). Abu minēto faktoru pārbaudei ir svarīga nozīme laboratorijas izmantotās testa sistēmas pareizas darbības nodrošināšanā, kā norādīts 26. un 27. punktā. Drošības apsvērumu dēļ, ievērojot labas laboratorijas prakses noteikumus, ir jāsagatavo katras pētījuma laikā izmantotās barības partijas reprezentatīvi paraugi, lai būtu iespējams noteikt fitoestrogēnu līmeni (piemēram, gadījumā, ja salīdzinājumā ar vēsturiskiem kontroldatiem ir vērojams liels dzemdes kontrolsvars, vai ja izpaužas nepietiekama atbildes reakcija uz estrogēna standartvielu, 17 α etinilestradiolu). Alikvotas ir jāanalizē pētījumā vai jāsasaldē –20 °C temperatūrā vai tā, lai paraugs nesāktu sadalīties pirms analīzes.

24. Daži guļvietas materiāli var saturēt dabiskas estrogēniskas vai antiestrogēniskas ķīmiskās vielas (piemēram, kukurūzas vālīte ietekmē ciklu žurkām un uzskatāms, ka tai piemīt antiestrogēniskas īpašības). Ir jāizvēlas guļvietas materiāls, kas satur iespējami maz fitoestrogēnu.

Dzīvnieku sagatavošana

25. Eksperimenta dzīvniekus, kuriem neizpaužas slimības vai fiziskās kroplības, nejaušināti sadala kontroles un vielas ievadīšanas grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Katram dzīvniekam ir jāpiešķir atsevišķa identifikācija. Aklimatizācijas periodā līdz atšķiršanai ieteicams nenobriedušus dzīvniekus turēt būros kopā ar māti vai to māti, kuras aprūpē ir nodoti dzīvnieku mazuļi. Jauniem pieaugušiem dzīvniekiem un nenobriedušiem dzīvniekiem, kurus piegādā ar māti vai māti, kuras aprūpē ir nodots mazulis, aklimatizācijas periodam pirms pētījuma sākuma ir jābūt apmēram 5 dienām. Ja nenobriedušus dzīvniekus saņem jau atšķirtus no mātes, nepieciešamais aklimatizācijas periods var būt īsāks, jo testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana ir jāsāk uzreiz pēc atšķiršanas (sk. 29. punktu).

PROCEDŪRA

Laboratorijas kvalifikācijas verificēšana

26. Laboratorijas kvalifikāciju var pārbaudīt ar divām pieejām:

— periodiskās verifikācijās, kurās izmanto sākotnēju pozitīvās kontroles izejdatu pētījumu (sk. 27. punktu). Vismaz ik pēc 6 mēnešiem un katru reizi, kad notiek izmaiņas, kas var ietekmēt testa rezultātus (piemēram, jauns barības preparāts, izmaiņas to darbinieku sastāvā, kas veic sekcijas, tiek izmantoti citas līnijas dzīvnieki vai cits piegādātājs utt.), testa sistēmas (dzīvnieku modeļa) reaģētspēju pārbauda, izmantojot attiecīgu devu estrogēna standartvielas (pamatojoties uz pozitīvās kontroles izejdatu pētījumu, kas aprakstīts 27. punktā), resp., 17α-etinilestradiola (*CAS* Nr. 57-63-6) (EE),

— vienlaicīgās kontrolēs, katrā testēšanā iekļaujot grupu, kurai ievada attiecīgu estrogēna standartvielas devu.

Ja sistēma reaģē nepareizi, ir jāpārbauda un attiecīgi jāmaina eksperimenta apstākļi. Ieteicamā estrogēna standartvielas deva, ko izmanto abās pieejās, ir apmēram ED 70–80.

▼M5

27. **Pozitīvās kontroles izejdatu pētījums** – pirms laboratorija pirmo reizi veic pētījumu, izmantojot šo testēšanas metodi, laboratorijas kvalifikācija ir jāpārbauda dzīvnieku modeļa reaģētspējas testēšanā, nosakot atbildes reakciju uz estrogēna standartvielas devu – ne mazāk kā četrām devām 17α-etinilestradiola (*CAS* Nr. 57-63-6) (EE). Ietekmi uz dzemdes svaru salīdzina ar vēsturiskiem datiem (sk. literatūras sarakstu (5)). Ja pozitīvās kontroles izejdatu pētījumā negūst vēlamos rezultātus, ir jāpārbauda un jāmaina eksperimenta apstākļi.

Dzīvnieku skaits un stāvoklis

28. Katrā devu saņemšanas un kontroles grupā jābūt vismaz 6 dzīvniekiem (gan metodei, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, gan metodei, kurā izmanto pieaugušus dzīvniekus, kam ir izoperētas olnīcas).

Nenobriedušu dzīvnieku vecums

29. Uterotropā biotestā izmantojot nenobriedušus dzīvniekus, ir jānorāda dzīvnieku dzimšanas datums. Devu ievadīšana ir jāsāk pietiekami agri, nodrošinot, lai pēc testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas vēl nebūtu konstatējams ar pubertāti saistīts endogēnā estrogēna fizioloģiskais pieaugums. No otras puses, ir liecības, ka ļoti jauni dzīvnieki var būt mazāk jutīgi. Lai noteiktu vislabāko vecumu, katrai laboratorijai būtu jāņem vērā savi pamatdati par nobriešanu.

Parasti žurkām devu var sākt ievadīt uzreiz pēc agrīnas atšķiršanas 18. dienā pēc piedzimšanas (piedzimšanas diena ir 0. diena pēc piedzimšanas). Ieteicams beigt žurkām ievadīt devu 21. dienā pēc piedzimšanas, bet noteikti pirms 25. dienas pēc piedzimšanas, jo šajā vecumā sāk darboties hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass un var sākt paaugstināties endogēnais estrogēna līmenis, un tas izraisa dzemdes svara vidējā izejlieluma un grupas standartnovirzes pieaugumu (2)(3)(10)(11)(12).

Olnīcu izoperēšanas procedūra

30. Žurku un peļu mātītēm, kurām izoperē olnīcas (kontroles grupas un vielas saņemšanas grupas), to dara 6–8 nedēļu vecumā. Minimālais laiks no olnīcu izoperēšanas brīža līdz pirmajai devas ievadīšanas dienai žurkām ir 14 dienas, lai dzemdes audi varētu samazināties līdz minimālam stabilam izejlielumam. Pelēm minimālais laiks no olnīcu izoperēšanas brīža līdz pirmajai devas ievadīšanas dienai ir 7 dienas. Pietiek ar nelielu daudzumu olnīcas audu, lai radītu ievērojamu estrogēnu cirkulācijas līmeni (3), tāpēc pirms izmantošanas dzīvnieki ir jāpārbauda, vismaz piecas dienas pēc kārtas (piemēram, žurkām 10.–14. dienā pēc olnīcu izoperēšanas) pārbaudot maksts uztriepē iegūtas epitēlija šūnas. Ja konstatē estrālā cikla sākšanās pazīmes, dzīvniekus izmantot nedrīkst. Turklāt izgriezto olnīcu vietas ir jāpārbauda autopsijā, lai pārliecinātos, ka nav palikušas olnīcas audu daļas. Ja olnīcas audu daļas ir palikušas, attiecīgo dzīvnieku aprēķinos neizmanto (3).

31. Olnīcu izoperēšanas procedūras sākumā dzīvnieku, kuram ir ievadīta vajadzīgā anestēzijas deva, nogulda uz vēdera. Iegriezumam, ar kuru atver dorsāli laterālo vēdera sienu, jābūt apmēram 1 cm garam un jāatrodas vidū starp paribi un gūžas kaulu, un dažus milimetrus uz sāniem no jostas muskuļa sānu malas. Olnīcu izņem no vēdera dobuma un novieto sterilā vietā. Olnīcu izgriež olvada un dzemdes savienojuma vietā. Pārliecinās, ka nav lielas asiņošanas, aizšuj vēdera dobumu un ādu savelk ar skavām vai piemērotu ķirurģisko diegu. Savienojuma vietas shematiski ir attēlotas 1. attēlā. Ir jāizmanto atbilstošs pēcoperācijas pretsāpju līdzeklis, ko iesaka grauzēju aprūpes jomā specializējies veterinārārsts.

▼M5

Ķermeņa svars

32. Metodē, kurā izmanto pieaugušus dzīvniekus, kam izoperētas olnīcas, ķermeņa svars nekorelē ar dzemdes svaru, jo pēdējo ietekmē hormoni, piemēram, estrogēni, nevis augšanas faktori, kas regulē ķermeņa apmērus. Lietojot metodi, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, gluži pretēji, nobriešanas laikā ķermeņa svars ir saistīts ar dzemdes svaru (34). Tāpēc, lietojot metodi, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējā svara. Tas nozīmē, ka audzētājam ir jāstandartizē metiena lielums, lai nodrošinātu, ka pēcnācēji, kas piedzimuši dažādām mātītēm, saņem apmēram vienādu barību. Dzīvnieki ir jāiedala grupās (kontroles un vielas ievadīšanas grupā) tos nejaušināti sadalot pēc svara, lai katras grupas vidējais ķermeņa svars statistiski neatšķirtos no otras grupas. Jāraugās, lai viena metiena dzīvniekus neiedalītu vienā un tajā pašā vielas ievadīšanas grupā, ja tas ir praktiski iespējams, nepalielinot izmantošanai pētījumā paredzēto metienu skaitu.

Dozējums

33. Lai noteiktu, vai testējamajai ķīmiskajai vielai var būt estrogēniska iedarbība *in vivo*, parasti pietiek ar divām vielas ievadīšanas grupām un kontroles grupu, un tāpēc dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ vēlams izmantot šādu modeli. Ja mērķis ir iegūt devas un atbildes reakcijas sakarības līkni vai datus ekstrapolēt uz mazākām devām, ir vajadzīgas vismaz 3 devu grupas. Ja ir vajadzīga ne tikai informācija par estrogēniskas darbības klātbūtni, bet arī papildu informācija (piemēram, par stiprumu), jāapsver, vai neizmantot citu devu došanas režīmu. Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada kopā ar nesējvielu, kontroles grupas dzīvnieki saņem tādu pašu nesējvielas daudzumu, ko izmanto vielas ievadīšanas grupai (vai, ja grupu rādītāji atšķiras, testa grupu dzīvniekiem izmantoto maksimālo tilpumu).

34. Uterotropā biotesta gadījumā mērķis ir izraudzīties tādas devas, lai dzīvnieki izdzīvotu un lai, dzīvniekiem tās ievadot trīs dienas pēc kārtas ar maksimālo devu 1 000 mg uz kg dienā, tiem nerastos vērā ņemama toksicitāte vai diskomforts. Devu līmeņi jāierosina un jāizraugās, ņemot vērā par testējamo ķīmisko vielu vai par radniecīgiem materiāliem pieejamos toksicitātes un (toksiko-)kinētikas datus. Izvēloties augstāku devas līmeni, pirmām kārtām jāņem vērā LD 50 un/vai informācija par akūto toksicitāti, lai neizraisītu dzīvnieku nāvi, smagas ciešanas vai diskomfortu (24)(25)(26). Augstākajai devai ir jābūt maksimālajai panesamajai devai; ir pieņemams arī pētījums par devas līmeni, kurā izraisīta pozitīva uterotropa atbildes reakcija. Skrīninga gadījumā parasti izmanto lielus devu intervālus (piemēram, puslogaritmiskas vienības, kas atbilst devas progresijai 3,2, vai līdz pat viens log vienības). Ja piemēroti dati nav pieejami, lai noteiktu izmantojamās devas, var veikt diapazona noteikšanas pētījumu.

35. Ja agonista estrogēnisko stiprumu var noteikt, izmantojot *in vitro* (vai *in silico*) datus, arī tos var ņemt vērā, izraugoties devu. Piemēram, testējamās ķīmiskās vielas tilpumu, kas radīs agonista standartvielai (etinilestradiolam) līdzvērtīgu uterotropu atbildes reakciju, nosaka pēc tā *in vitro* noteiktā relatīvā stipruma attiecībā pret etinilestradiolu. Augstāko testa devu iegūst, minēto līdzvērtīgo devu attiecīgi reizinot, piemēram, ar 10 vai 100.

▼M5

Apsvērumi par diapazona noteikšanu

36. Vajadzības gadījumā ar nedaudziem dzīvniekiem var veikt diapazona noteikšanas priekšpētījumu. Šajā sakarā var izmantot ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 19 (25), kur noteiktas klīniskās pazīmes, kas liecina par dzīvnieku toksicitāti vai diskomfortu. Ja minētajā diapazona noteikšanas pētījumā pēc tam, kad deva ir ievadīta trīs dienas, tas iespējams, apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas dzīvniekiem var izgriezt un nosvērt dzemdi. Iegūtos datus pēc tam var izmantot galvenā pētījuma plānam (izvēlēties pieņemamu maksimālo un minimālo devu un noteikt ieteicamo devu grupu skaitu).

Devu ievadīšana

37. Testējamo ķīmisko vielu ievada, izmantojot mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju. Izvēloties devas ievadīšanas ceļu, ir jāņem vērā dzīvnieku labturības apsvērumi un tādi toksikoloģiskie aspekti kā iespējamā cilvēka ekspozīcija (piemēram, ar mākslīgo barošanu modelē testējamās vielas nonākšanu barības vadā, ar zemādas injekciju modelē testējamās vielas ieelpošanu vai adsorbciju no ādas), testējamā materiāla fizikālķīmiskās īpašības un jo īpaši esošā toksikoloģiskā informācija un dati par metabolismu un kinētiku (piemēram, konkrēts ceļš dod iespēju izvairīties no priekšlaicīga metabolisma, nodrošina labāku efektivitāti).

38. Ja vien iespējams, ieteicams lietošanai izraudzīties šķīdumu/suspensiju uz ūdens bāzes. Bet tā kā lielākā daļa estrogēna ligandu vai to metabolisko priekšteču ir hidrofobi, parasti izmanto eļļas (piemēram, kukurūzas, zemesriekstu vai sezama eļļas vai olīveļļas) šķīdumu/suspensiju. Tomēr minēto eļļu kaloriju un tauku saturs ir atšķirīgs, un tāpēc nesējviela var ietekmēt kopējo uzņemtās metabolizējamās enerģijas daudzumu, kas var mainīt mērīšanas beigupunktu, piemēram, dzemdes svaru, jo īpaši, lietojot metodi, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus (33). Tāpēc pirms pētījuma visas nesējvielas, ko paredzēts izmantot, ir jāpārbauda, izmantojot kontroles bez nesējvielām. Testējamo ķīmisko vielu var izšķīdināt minimālā daudzumā 95 % etanola šķīduma vai cita atbilstoša šķīdinātāja un līdz galīgajai darba koncentrācijai atšķaidīt testa nesējvielā. Ir jāzina šķīdinātāja toksiskās īpašības, un tām jābūt testētām atsevišķā kontroles grupā, kurai izmanto tikai šķīdinātāju. Ja testējamā ķīmiskā viela ir stabila, tās šķīdināšanā var izmantot vieglu sildīšanu un spēcīgu mehānisku iedarbību. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte nesējvielā. Ja visu pētījuma laiku testējamā ķīmiskā viela ir stabila, var sagatavot vienu ķīmiskās vielas sākuma alikvotu un katru dienu sagatavot devas atšķaidījumus pēc specifikācijām.

39. Devas ievadīšanas laiks ir atkarīgs no izmantotā modeļa (informāciju par nenobriedušu dzīvnieku modeli sk. 29. punktā un dzīvnieku, kam ir izoperētas olnīcas, modeli sk. 30. punktā). Nenobriedušām žurku mātītēm testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu trīs dienas pēc kārtas. Vielu ievadīt trīs dienas pēc kārtas ir ieteicams arī žurku mātītēm, kurām ir izoperētas olnīcas, bet var izmantot arī ilgāku ekspozīciju, kas var palīdzēt vieglāk noteikt ķīmiskās vielas ar vāju aktivitāti. Peļu mātītēm, kurām ir izoperētas olnīcas, attiecībā uz spēcīgiem estrogēna agonistiem ir jāpietiek devu ievadīt 3 dienas, un devas ievadīšanas laika pagarināšana līdz septiņām dienām nedos būtiskas priekšrocības, tomēr minētais kopsakars attiecībā uz vājiem estrogēniem validācijas pētījumā (16) nav novērots, un tāpēc pelēm, kurām ir izoperētas olnīcas, devu došana jāpaildzina līdz 7 dienām pēc kārtas.Deva katru dienu jāievada vienā laikā. Deva pēc vajadzības jākoriģē, lai saglabātu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (piemēram, testējamās ķīmiskās vielas mg uz kg ķermeņa svara dienā). Iedarbība, ko rada testiem lietotā tilpuma mainība attiecībā pret ķermeņa svaru, ir jāsamazina līdz minimumam, ievadāmā šķīduma koncentrāciju koriģējot tā, lai pie visām devām attiecībā pret ķermeņa svaru un neatkarīgi no devas ievadīšanas ceļa tilpums būtu vienāds.

▼M5

40. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienā devā reizi dienā. Maksimālais šķidruma daudzums, ko vienā reizē var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Ir jāievēro vietējie dzīvnieku aprūpes noteikumi, taču tilpums nedrīkst pārsniegt 5 ml uz kg ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumus, ko var ievadīt 10 ml uz kg ķermeņa svara.

41. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar zemādas injekciju, viela jāievada vienā devā reizi dienā. Devu ievada mugurā, plecu vai jostasvietas zonā, izmantojot sterilu adatu (piemēram, 23. vai 25. izmērs) un turbekulīna šļirci. Injekcijas vietu var nenoskūt. Vielas zudumi, noplūdes injekcijas vietā vai nepilnīga devas ievadīšana ir jāreģistrē. Kopējais tilpums, ko injicē žurkai dienā, nedrīkst pārsniegt 5 ml uz kg ķermeņa svara, izmantojot 2 injicēšanas vietas, izņemot gadījumus, kur ievada ūdens šķīdumus, ko var ievadīt 10 ml uz kg no ķermeņa svara.

Novērojumi

Vispārīgie un klīniskie novērojumi

42. Vispārīgi klīniskie novērojumi jāizdara vismaz reizi dienā un, ja konstatē toksicitātes pazīmes, tad biežāk. Novērojumi katru dienu jāizdara vienā laikā, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc devu došanas. Visi dzīvnieki jānovēro attiecībā uz mirstību, saslimstību un vispārīgām klīniskām pazīmēm, piemēram, uzvedības, ādas, apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī veģetatīvās aktivitātes pārmaiņām (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas un nerakstūrīga elpošana) un sekrēcijas un izdalījumu klātbūtni.

Ķermeņa svars un barības patēriņš

43. Visi dzīvnieki jāsver katru dienu līdz tuvākajai 0,1 g vienībai, sākot ar brīdi tieši pirms pirmās devas ievadīšanas, t. i., kad dzīvnieki ir sadalīti grupās. Par izvēles mērījumu var izmantot arī barības patēriņu devu došanas laikā uz vienu būri, nosverot barības traukus. Barības patēriņa mērījumu rezultātus izsaka gramos uz vienu žurku dienā.

Secēšana un dzemdes svara noteikšana

44. Divdesmit četras stundas pēc devas pēdējās ievadīšanas reizes žurkas humāni nonāvē. Ideālā gadījumā autopsija jāizdara pa grupām nejaušinātā kārtībā, lai secība nebūtu vienā vai otrā virzienā pa devu grupām, un tādējādi nebūtu nedaudz ietekmēti dati. Biotesta mērķis ir noteikt dzemdes natīvo svaru un saussvaru. Natīvajā svarā ietilpst dzemdes un lūmena šķidruma svars. Dzemdes saussvaru nosaka tad, kad no dzemdes ir izspiests un izvadīts lūmena šķidrums.

45. Pirms secēšanas nenobriedušiem dzīvniekiem pārbauda maksti, lai noskaidrotu, vai tā ir atvērusies. Secēšanas procedūras sākumā atgriež vēdera dobumu, sākot ar kaunuma kaula simfīzes centru. Pēc tam no vēdera dobuma aizmugurējās sienas atdala dzemdes ragu un olnīcas, ja tādas ir. No dzemdes un maksts priekšpuses un sānu puses atdala urīnpūsli un urīnvadus. Saistaudu savienojumu starp anālo atveri un maksti atgriež līdz vietai, kur redzams maksts atveres savienojums ar starpenes ādu. Dzemdi un maksti no ķermeņa atdala, griežot maksts sieniņu tieši virs starpenes ādas savienojuma vietas, kā parādīts 2. attēlā. Dzemdi no vēdera dobuma izgriež, uzmanīgi pārgriežot dzemdes apzarni tā piestiprināšanās vietā pa abu dzemdes

▼M5

ragu aizmugurējo daļu visā garumā. Kad dzemde izņemta no vēdera dobuma, ir jārīkojas ātri, lai audi neizžūtu. Svara zudumam izžūšanas dēļ jāpievērš lielāka uzmanība neliela apjoma audu, piemēram, dzemdes gadījumā (23). Ja dzīvniekam ir olnīcas, tās izgriež pie olvadiem tā, lai no dzemdes raga neiztek lūmena šķidrums. Ja dzīvniekam olnīcas ir izoperētas, izgriezuma vietas pārbauda, lai noteiktu, vai nav palikušas olnīcas audu daļas. Nogriež liekos taukus un saistaudus. Maksti no dzemdes atdala tieši zem dzemdes kakla tā, lai dzemdes kakls paliktu dzemdē, kā parādīts 2. attēlā.

46. Katru dzemdi ievieto atsevišķi marķētā un nosvērtā tvertnē (piemēram, Petri platē vai plastmasas mērtraukā), rūpīgi raugoties, lai tā pirms svēršanas neizžūtu (piemēram, tvertnē var ieklāt filtrpapīru, kas mazliet samitrināts fizioloģiskajā šķīdumā). Dzemdi ar lūmena šķidrumu nosver līdz tuvākajai 0,1 g vienībai (dzemdes natīvais svars).

47. Pēc tam katru dzemdi apstrādā atsevišķi, lai izvadītu lūmena šķidrumu. Abus dzemdes ragus pārdur vai gareniski pārgriež. Dzemdi noliek uz mazliet samitrināta filtrpapīra (piemēram, Vatmaņa papīrs Nr. 3) un ar otru mazliet samitrinātu filtrpapīru viegli uzspiež, lai izvadītu atlikušo lūmena šķidrumu. Dzemdi, kurai ir izvadīts lūmena šķidrums, nosver līdz tuvākajai 0,1 g vienībai (dzemdes saussvars).

48. Pētījuma beigās konstatēto dzemdes svaru var izmantot, lai pārliecinātos, ka nenobriedušajām žurkām nav pārsniegts attiecīgais vecums, tomēr šajā sakarā svarīgāki ir vēsturiskie dati par laboratorijā izmantoto žurku līniju. (par rezultātu interpretāciju sk. 56. punktu).

Neobligātie izmeklējumi

49. Pēc nosvēršanas dzemdi var ielikt fiksācijas šķīdumā (10 % neitrālā buferētā formalīnā), lai varētu veikt histopatoloģisko izmeklēšanu pēc iekrāsošanas ar hematoksilīnu un eozīnu. Attiecīgi var izmeklēt maksti (sk. 9. punktu). Turklāt kvantitatīvai salīdzināšanai var izmantot endometriskā epitēlija morfometrisku mērīšanu.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

50. Pētījuma rezultātos ietilpst:

— dzīvnieku skaits testa sākumā,

— to dzīvnieku skaits un identitāte, kas testēšanas laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas datums un laiks,

— to dzīvnieku skaits un identitāte, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, un

— to dzīvnieku skaits un identitāte, kam novēroti audu bojājumi, un bojājumu veida apraksts.

▼**M5**

51. Par atsevišķiem dzīvniekiem atspoguļotie dati ir ķermeņa svars, dzemdes natīvais svars un dzemdes saussvars. Vienpusēju statistisko analīzi attiecībā uz agonistiem izmanto, lai noteiktu, vai testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana veicinājusi statistiski nozīmīgu ($p < 0,05$) dzemdes svara pieaugumu. Attiecīga statistiskā analīze ir jāveic, lai pārbaudītu ar vielas ievadīšanu saistītas dzemdes saussvara un dzemdes natīvā svara izmaiņas. Piemēram, datus var novērtēt ar kovariācijas analīzes (*ANCOVA*) pieeju, par vienu no mainīgajiem izmantojot ķermeņa svaru autopsijas laikā. Pirms analizēt datus par dzemdēm, ar tiem var veikt dispersiju izlīdzinošu logaritmisko transformāciju. Lai salīdzinātu devu grupu un nesējvielas kontroles grupu pārus un lai aprēķinātu ticamības intervālus, piemēroti ir Doneta un *Hsu* testi. Lai noteiktu iespējamos "izlēcējus" un novērtētu dispersiju homogenitāti, var izmantot stjūdentizētus atlikumu grafikus. Minētās procedūras tika izmantotas ESAO validācijas programmā, statistiskās analīzes sistēmas (*SAS Institute*, *Cary*, *NC*) 8. versijā izmantojot *PROC GLM* (6)(7).

52. Galīgajā ziņojumā iekļauj šādu informāciju:

Testēšanas iekārta:

— atbildīgie darbinieki un viņu pienākumi pētījumā,

— pozitīvās kontroles izejdatu testa dati un regulāri pozitīvās kontroles dati (sk. 26. un 27. punktu).

Testējamā ķīmiskā viela:

— testējamās ķīmiskās vielas īpašības,

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības,

— atšķaidījumu pagatavošanas veids un biežums,

— visi apkopotie dati par stabilitāti,

— visi ievadāmā šķīduma analīzes rezultāti.

Nesējviela:

— testējamās nesējvielas īpašības (veids, piegādātājs un partijas numurs),

— nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga un līnija un izvēles pamatojums,

— piegādātājs un konkrētā piegādātājiestāde,

— vecums piegādes brīdī un dzimšanas datums,

— ja piegādāti nenobrieduši dzīvnieki, norādīt vai tie piegādāti ar māti vai to māti, kuras aprūpē ir nodoti dzīvnieku mazuļi, un atšķiršanas datums,

— dati par dzīvnieku aklimatizācijas procedūru,

— dzīvnieku skaits vienā būrī,

— atsevišķu dzīvnieku un to grupu identifikācijas veids un paņēmiens.

Testēšanas apstākļi:

— nejaušināšanas procesa apraksts (t. i., izmantotā metode),

— izraudzīto devu pamatojums,

▼M5

— sīkas ziņas par testējamās ķīmiskās vielas preparāta sagatavošanu, iegūtā koncentrācija, stabilitāte un homogenitāte,

— sīkas ziņas par testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu un ekspozīcijas veida izvēles pamatojums,

— barība (nosaukums, veids, piegādātājs, sastāvs un fitoestrogēnu līmenis, ja zināms),

— ūdens izcelsme (piemēram, krāna ūdens vai filtrēts ūdens) un piegādes veids (pa caurulēm no lielākas tvertnes, pudelēs utt.),

— guļvietas (nosaukums, veids, piegādātājs, sastāvs),

— apraksts par apstākļiem būros, apgaismojuma intervāli, telpu temperatūra, relatīvais mitrums un to uzkopšana,

— autopsijas un dzemdes svēršanas procedūru sīks apraksts,

— statistisko procedūru apraksts.

Rezultāti

Par katru dzīvnieku:

— katru dienu katra dzīvnieka svars (sākot ar brīdi, kad tie iedalīti grupās, un beidzot ar autopsiju) (līdz tuvākajai 0,1 g vienībai),

— katra dzīvnieka vecums (dienās, sākot ar dzimšanas dienu – 0. dienu pēc piedzimšanas), kad sāk ievadīt testējamo ķīmisko vielu,

— katras devas ievadīšanas datums un laiks,

— aprēķinātais ievadītās devas tilpums un deva un novērojumi par devas zudumiem vielas ievadīšanas brīdī vai pēc devas ievadīšanas,

— katru dienu reģistrēts dzīvnieka statuss, arī simptomi un novērojumi,

— iespējamais nāves cēlonis (ja pētījuma laikā konstatēts pirmsnāves stāvoklis vai nāve),

— humānās nonāvēšanas datums un laiks un laiks no pēdējās devas ievadīšanas brīža līdz nonāvēšanas brīdim,

— dzemdes natīvais svars (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai) un novērotais lūmena šķidruma zudums secēšanas laikā un sagatavojot dzemdi svēršanai,

— dzemdes saussvars (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai).

Visām dzīvnieku grupām:

— vidējais ķermeņa svars katru dienu (līdz tuvākajai 0,1 g vienībai) un standartnovirzes (no brīža, kad dzīvnieki sadalīti grupās, līdz autopsijai),

— vidējais dzemdes natīvais svars un vidējais dzemdes saussvars (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai) un standartnovirzes,

— barības patēriņš dienā, ja to mēra (aprēķina patērētās barības gramos uz vienu dzīvnieku),

▼M5

— statistiskās analīzes rezultāti par devu grupu dzīvnieku dzemdes natīvā svara un saussvara salīdzinājumu ar attiecīgajiem nesējvielas kontroles grupas mērījumiem,

— statistiskās analīzes rezultāti par devu grupu dzīvnieku kopējā ķermeņa svara un ķermeņa svara pieauguma salīdzinājumu ar attiecīgajiem mērījumiem nesējvielas kontroles grupā.

53. Svarīgu norādījumu apkopojums attiecībā uz testēšanas metodi

	Žurkas	**Peles**
Dzīvnieki		
Līnija	Parasti izmantotā laboratorijas grauzēju līnija	
Dzīvnieku skaits	Vismaz 6 dzīvnieki vienā devas grupā	
Grupu skaits	Vismaz 2 testa grupas (norādījumus sk. 33. punktā) un negatīvās kontroles grupa Norādījumi par pozitīvās kontroles grupām ir sniegti 26. un 27. punktā	
Turēšanas un barošanas apstākļi		
Temperatūra dzīvnieku turēšanas telpā	22 °C ± 3 °C	
Relatīvais mitrums	50–60 % un ne mazāk kā 30 % vai ne vairāk kā 70 %	
Apgaismojuma intervāli	12 stundas apgaismojumā un 12 stundas tumsā	
Barība un dzeramais ūdens	Ad libitum	
Turēšanas apstākļi	Atsevišķi vai grupās līdz trīs dzīvniekiem (nenobriedušus dzīvniekus ieteicams turēt, veidojot sociālās grupas)	
Uzturs un guļvietas	Ieteicams, lai uzturā un guļvietās būtu zems fitoestrogēna līmenis	
Protokols		
Metode	Metode, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, kam nav izoperētas olnīcas (ieteicamā metode) Metode, kurā izmanto pieaugušas mātītes, kam izoperētas olnīcas	Metode, kurā izmanto pieaugušas mātītes, kam izoperētas olnīcas
Vecums devu došanas brīdī nenobriedušiem dzīvniekiem	Ne agrāk kā 18. dienā pēc dzimšanas. Devu došana jābeidz līdz 25. dienai pēc dzimšanas	Šai testēšanas metodē neizmanto
Vecums, kad izoperē olnīcas	6–8 nedēļu vecumā	
Vecums devu došanas brīdī dzīvniekiem, kuriem izoperētas olnīcas	Intervālam starp olnīcu izoperēšanu un devu došanas 1. dienu ir jābūt vismaz 14 dienām	Intervālam starp olnīcu izoperēšanu un devu došanas 1. dienu ir jābūt vismaz 7 dienām
Ķermeņa svars	Ķermeņa svara svārstībām ir jābūt minimālām, un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara	

▼M5

	Žurkas	Peles
Devu ievadīšana		
Ievadīšanas ceļš	Ar mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju	
Devas ievadīšanas biežums	Viena deva dienā	
Ar mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju ievadītās devas tilpums	≤ 5 ml uz kg no ķermeņa svara (vai līdz 10 ml uz kg no ķermeņa svara gadījumos, kad ievada ūdens šķīdumu) (2 injekcijas vietās zemādas injekcijas gadījumā)	
Devas ievadīšanas periods	Metodei, kurā izmanto nenobriedušus dzīvniekus, 3 dienas pēc kārtas Metodei, kurā izmanto pieaugušus dzīvniekus, kam izoperētas olnīcas, vismaz 3 dienas pēc kārtas	Metodei, kurā izmanto pieaugušus dzīvniekus, kam izoperētas olnīcas, 7 dienas pēc kārtas
Autopsijas laiks	Apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas	
Rezultāti		
Pozitīva atbildes reakcija	Vidējā dzemdes (natīvais svars un/vai saussvars) svara statistiski nozīmīgs pieaugums	
Estrogēna standartviela	17α etinilestradiols	

NORĀDĪJUMI PAR REZULTĀTU INTERPRETĀCIJU UN PIEŅEMAMĪBU

54. Parasti tiek uzskatīts, ka estrogenitātes tests ir pozitīvs, ja salīdzinājumā ar grupu, kurai izmanto šķīdinātāju, vismaz augstajā devu līmenī ir konstatēts dzemdes svara statistiski nozīmīgs pieaugums ($p < 0,05$). Pozitīvus rezultātus pamato, pierādot bioloģiski ticamu sakarību starp devu un atbildes reakcijas stiprumu, ņemot vērā to, ka līkni, kas raksturo atbildes reakciju uz devu, var ietekmēt testējamās ķīmiskās vielas estrogēniskās un antiestrogēniskās darbības pārklāšanās.

55. Jāraugās nepārsniegt maksimālo panesamo devu, lai datus varētu statistiski interpretēt. Šajā gadījumā ir uzmanīgi jānovērtē ķermeņa svara samazināšanās, klīniskās pazīmes un citi konstatējumi.

56. Lai uterotropā biotesta dati būtu pieņemami, ir svarīgi novērtēt dzemdes svaru nesējvielas kontroles grupas dzīvniekiem. Augstas kontrolvērtības var negatīvi ietekmēt biotesta reaģētspēju un spēju noteikt ļoti vājus estrogēnu agonistus. Literatūras avoti un dati, kas iegūti uterotropā biotesta validācijas procesā, liecina, ka ir iespējami spontāni augsta vidējā vērtība kontrolgrupās, jo īpaši nenobriedušiem dzīvniekiem (2)(3)(6)(9). Tā kā nenobriedušām žurkām dzemdes svaru ietekmē vairāki mainīgie, piemēram, līnija vai ķermeņa svars, dzemdes svara precīza maksimālā robežvērtība nav nosakāma. Orientējoši rezultātus var uzskatīt par aizdomīgiem, ja dzemdes saussvars nenobriedušu žurku kontroles grupā ir no 40 līdz 45 mg, un, ja dzemdes svars pārsniedz 45 mg, tests jāatkārto. Tomēr katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi (3)(6)(8). Testējot pieaugušas žurkas, kurām olnīcas nav pilnīgi izoperētas, palikušajos olnīcas audos var producēties endogēns estrogēns un kavēt dzemdes svara samazināšanos.

▼M5

57. Lai rezultāti būtu pieņemami, nesējvielas kontroles grupas žurku dzemdes saussvaram nenobriedušām žurku mātītēm ir jābūt mazākam nekā 0,09 % no ķermeņa svara, bet jaunām pieaugušām žurku mātītēm, kurām ir izoperētas olnīcas, – mazākam nekā 0,04 % no ķermeņa svara [sk. 31. tabulu (2)]. Ja dzemdes svars kontroldzīvniekiem ir lielāks, ir jāizskata vairāki faktori, arī, kāds bijis dzīvnieku vecums, vai olnīcas izoperētas pareizi, kāds bijis fitoestrogēnu daudzums barībā, un citi faktori, un negatīvi testēšanas rezultāti (estrogēniska darbība nav konstatēta) ir jāizmanto piesardzīgi.

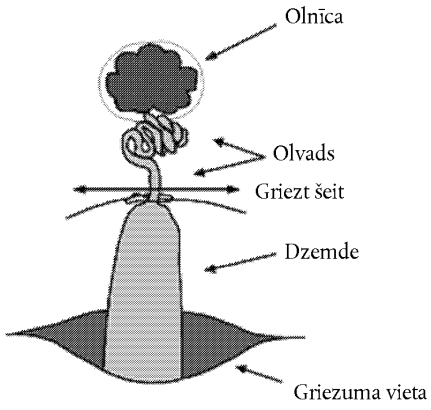
58. Agrāk iegūti nesējvielas kontroles grupas dati ir jāsaglabā laboratorijā. Laboratorijā ir jāsaglabā arī agrāk iegūti dati par reakciju uz pozitīvām estrogēna standartvielām, piemēram, 17α-etinilestradiolu. Laboratorijās var testēt arī reakciju uz zināmiem vājiem estrogēnu agonistiem. Visus minētos datus var salīdzināt ar pieejamajiem datiem (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), lai garantētu, ka laboratorijas metodes nodrošina pietiekamu jutību.

59. ESAO validācijas pētījumā dzemdes saussvara mainība bija mazāka nekā dzemdes natīvā svara mainība (6)(7). Tomēr būtiska atbildes reakcija jebkurā no šiem parametriem liecinātu, ka attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu ir konstatēta estrogēniska aktivitāte.

60. Uterotropu atbildes reakciju neizraisa tikai estrogēni, tomēr uterotropajā biotestā gūts pozitīvs rezultāts kopumā jāinterpretē kā *in vivo* liecība par iespējamu estrogenitāti, un tādā gadījumā parasti ir jārīkojas, lai jautājumu precizētu (sk. 9. punktu un "ESAO konceptuālo pamatdokumentu: endokrīnās sistēmas darbības traucējumus izraisošu vielu testēšana un novērtēšana", 2. papildinājums).

1. attēls

Shematiska diagramma, kurā attēlots, kā izoperēt olnīcas.



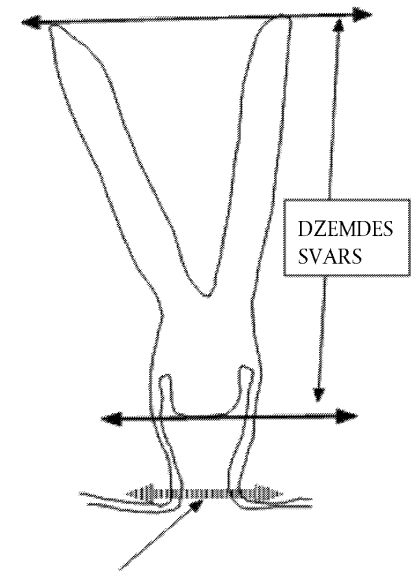
Taukplēve, asinsvadi un tauku spilventiņš

Procedūras sākumā izdara iegriezumu vēderā starp paribi un gūžas kaulu, un dažus milimetrus uz sāniem no jostas muskuļa sānu malas. Vēdera dobumā atrod olnīcas. Sterilā operācijas laukā olnīcas izņem no vēdera dobuma, starp olnīcu un dzemdi ievieto ligatūru, lai kontrolētu asiņošanu, un, izdarot iegriezumu virs ligatūras, olvada un katra dzemdes raga savienojuma vietā, izņem olnīcas. Pārliecinoties, ka nav vērojama liela asiņošana, vēdera dobumu aizšuj un ādu savelk, piemēram, ar skavām vai ķirurģiskiem diegiem. Pirms dzīvnieku izmantošanas vismaz 14 dienas ir jāļauj dzīvniekiem atkopties un dzemdes svaram atjaunoties.

▼**M5**

2. attēls

Dzemdes audu izgriešana un sagatavošana svēršanai.



Procedūras sākumā atgriež vēdera dobumu, sākot ar kaunuma kaula simfīzes centru. Pēc tam no vēdera dobuma aizmugurējās sienas atdala dzemdes ragus un olnīcas, ja tādas ir. No dzemdes un maksts priekšpuses un sānu puses atdala urīnpūsli un urīnvadus. Saistaudu savienojumu starp anālo atveri un maksti atgriež līdz vietai, kur redzams maksts atveres savienojums ar starpenes ādu. Dzemdi un maksti no ķermeņa atdala, griežot maksts sieniņu tieši virs starpenes ādas savienojuma vietas, kā parādīts attēlā. Dzemdi no vēdera dobuma atdala, uzmanīgi pārgriežot dzemdes apzarni tā piestiprināšanās vietā pa abu dzemdes ragu aizmugurējo daļu visā garumā. Kad dzemde no ķermeņa izņemta, nogriež liekos taukus un saistaudus. Ja dzīvniekam ir olnīcas, tās izgriež pie olvadiem tā, lai no dzemdes raga neiztek lūmena šķidrums. Ja dzīvniekam olnīcas ir izoperētas, izgriezuma vietas pārbauda, lai noteiktu, vai nav palikušas olnīcas audu daļas. Maksti no dzemdes atdala tieši zem dzemdes kakla tā, lai dzemdes kakls paliktu dzemdē, kā parādīts attēlā. Pēc tam dzemdi var nosvērt.

▼M5

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Antiestrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt estradiola 17 ß darbību.

Ķīmiskā viela ir viela vai maisījums.

Dzimšanas diena ir 0. diena pēc piedzimšanas.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daudzums. Uterotropajā biotestā devu izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas svaru uz vienu testa dzīvnieka ķermeņa svara vienību dienā (piemēram, mg uz kilogramu ķermeņa svara dienā).

Maksimālā panesamā deva ir lielākais daudzums testējamās ķīmiskās vielas, ko ievadot, testa dzīvnieks netiek nonāvēts (apzīmē kā LD_0) (*IUPAC*, 1993).

Estrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā darboties kā estradiolam 17 ß.

X. diena pēc piedzimšanas ir X. dzīves diena pēc dzimšanas.

Jutība ir visu to pozitīvo/aktīvo ķīmisko vielu īpatsvars, ko pareizi kvalificē ar šo testu. Tas ir mērs, kas raksturo testēšanas metodes precizitāti nepārprotami skaidru rezultātu iegūšanā, un svarīgs faktors, kas jāņem vērā, novērtējot testēšanas metodes piemērotību.

Specifiskums ir ar visu to negatīvo/neaktīvo testējamo ķīmisko vielu īpatsvars, ko pareizi kvalificē ar šo testu. Tas ir mērs, kas raksturo testēšanas metodes precizitāti nepārprotami skaidru rezultātu iegūšanā, un svarīgs faktors, kas jāņem vērā, novērtējot testēšanas metodes piemērotību.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai maisījums, ko pārbauda, izmantojot šo testēšanas metodi.

Uterotrops ir termins, ko izmanto, lai raksturotu pozitīvu ietekmi uz dzemdes audu augšanu.

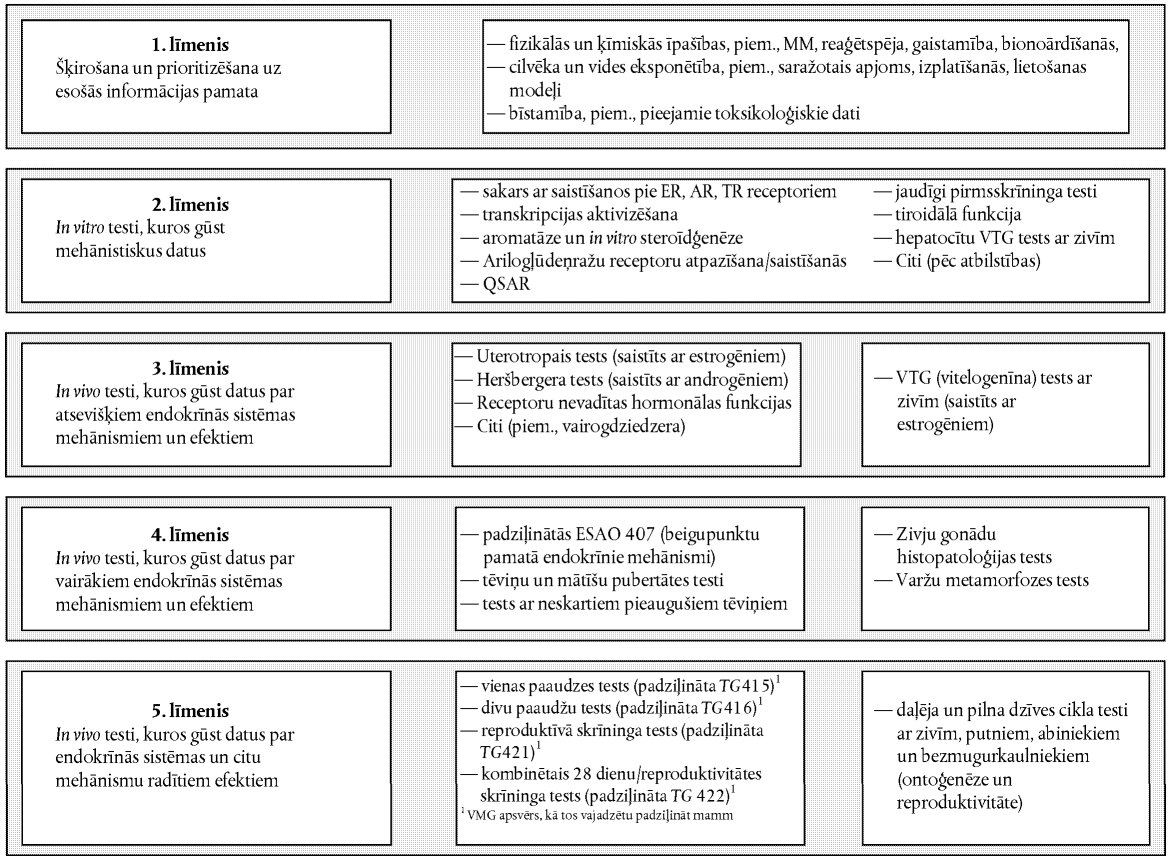
Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās uzticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

▼M5

2. papildinājums

Piezīme: Dokumentu sagatavojis Testēšanas vadlīniju programs sekretariāts, pamatojoties uz EDTA darbības grupas 6. sanāksmē panākto vienošanos

ESAO konceptuālais pamatdokuments: endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošo ķīmisko vielu testēšana un novērtēšana



ZVPG: Zīdītāju testēšanas un novērtējuma validācijas pārvaldības grupa

▼**M5**

PIEZĪMES PAR REGULĒJUMU

1. piezīme. Pievienošanās un aiziešana ir iespējama visos līmeņos, un tā ir atkarīga tikai no tā, kāda esošā informācija ir vajadzīga bīstamības un riska noteikšanai.

2. piezīme. 5. līmenī ekotoksikoloģijā jāiekļauj beigupunkti, kas norāda uz negatīvās ietekmes mehānismiem, un iespējamo kaitējumu populācijai.

3. piezīme. Ja multimodāls modelis aptver vairākus testus, kas pastāv arī atsevišķi viena beigupunkta analīzei, minētos atsevišķa beigupunkta analīzes testus aizstāj ar šādu modeli.

4. piezīme. Katra ķīmiskā viela katrā gadījumā jānovērtē atsevišķi, ņemot vērā visu pieejamo informāciju un regulējuma līmeņu funkcijas.

5. piezīme. Šis regulējums pašlaik ir nepilnīgs. 3., 4. un 5. līmenī ir minētas analīzes, kas ir pieejamas vai kuras ir paredzēts apstiprināt tuvākajā laikā. Analīzes, kuras ir paredzēts apstiprināt, tiek iekļautas provizoriski. Tiklīdz tās būs pabeigtas un apstiprinātas, tās tiks oficiāli iekļautas šajā regulējumā.

6. piezīme. 5. līmenis neattiecas tikai uz galīgajiem testiem. Minētajā līmenī iekļautie testi papildina vispārīgo bīstamības un riska novērtējumu.

▼**M5**

LITERATŪRA

(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. 71.

(38) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).

▼M5

B.55. **HERŠBERGERA BIOTESTS AR ŽURKĀM: (ANTI)ANDROGĒNO ĪPAŠĪBU ĪSĀ SKRĪNINGA TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 441 (2009. gads). Lai pārskatītu esošos un izveidotu jaunus noteikumus attiecībā uz iespējamo endokrīnās sistēmas darbības traucējumu skrīningu un testēšanu, 1998. gadā ESAO sāka augstas prioritātes rīcību (1). Viens no šīs rīcības mērķiem bija izveidot testēšanas norādījumus Heršbergera biotestam ar žurkām. Farmācijas nozare šo testēšanas metodi izmantoja vairākus gadu desmitus, un 1962. gadā oficiāla ekspertu komiteja to pirmo reizi standartizēja kā skrīninga rīku androgēnu ķīmisko vielu noteikšanai (2). No 2001. līdz 2007. gadam Heršbergera biotestam ar žurkām tika veikta plaša validācijas programma un tika sagatavots papildinformācijas pārskata dokuments (23), sīki izstrādāts metožu apkopojums (3), izstrādāti secēšanas norādījumi (21) un norādījumi, kā veikt laboratorijas un starplaboratoriju pētījumus, lai nodrošinātu ticamu un piemērotu biotestēšanu. Minēto validāciju veica ar spēcīgu androgēnu standartvielu (testosterona propionātu (TP)), diviem spēcīgiem sintētiskiem androgēniem (trenbolona acetātu un metiltestosteronu), spēcīgu antiandrogēnu farmaceitisko preparātu (flutamīdu), spēcīgu dabiskā androgēna (dihidrotestosterona-DHT) sintēzes (finasterīda) inhibitoru, dažiem vājiem antiandrogēniem pesticīdiem (linuronu, vinklozolīnu, procimidonu, *p,p'DDE*), spēcīgu 5α reduktāzes inhibitoru(finasterīdu) un divām zināmām negatīvām ķīmiskām vielām (dinitrofenoluun nonilfenolu) (4) (5) (6) (7) (8). Šī testēšanas metode tika izveidota, ņemot vērā daudzu gadu biotestēšanas pieredzi un pieredzi, kas iegūta testa programmas laikā un izmantojot šīs programmas rezultātus.

2. Heršbergera biotests ir *in vivo* īsā skrīninga tests, kurā izmanto tēviņu reproduktīvā trakta akcesoros audus. Šis tests tika izveidots 1930. gados un labots 1940. gados, kad tajā iekļāva tēviņu reproduktīvā trakta muskuļus, kas reaģē uz androgēniem (2) (9-15). 1960. gados, izmantojot protokola standartizētu versiju (2) (14), tika novērtēti vairāk nekā 700 iespējamo androgēnu, un 1960. gados minētā testa izmantošana androgenitātes un antiandrogenitātes noteikšanai tika uzskatīta par standarta metodi (2) (15). Šā biotesta pamatā ir pubertātes sākumposmā kastrētiem žurku tēviņiem vērojamas svara izmaiņas piecos audu veidos, uz kuriem iedarbojas androgēns. Šajā testā novērtē ķīmiskas vielas spēju izraisīt bioloģisko aktivitāti, kas savienojama ar dabiskā androgēna agonistiem, antagonistiem vai 5α reduktāzes inhibitoru. Pieci testā izmantotie audu veidi, uz kuriem iedarbojas androgēns, ir vēdera prostata (VP), sēklas pūslīši (*SV*) (ar koagulācijas dziedzeriem un to šķidrumiem), tūpļa cēlājmuskulisun priekštelpas sīpola un briedumķermeņa (*LABC*) muskulis, Kupera dziedzeris un dzimumlocekļa galviņa (*GP*). Kastrētiem žurku tēviņiem pubertātes sākumposmā androgēna ietekmē minēto piecu audu absolūtais svars pieaug. Stimulējot minētos audus, lai palielinātu svaru, ievadot spēcīgu androgēnu standartvielu, minētie pieci audi reaģē uz antiandrogēnu, un to absolūtais svars samazinās. Sākumā Heršbergera biotestā izmantoja ķirurģiski kastrētus tēviņus pubertātes sākumposmā, un tas tika apstiprināts Heršbergera validācijas programmas 1., 2. un 3. fāzē.

3. Heršbergera biotestu izmanto kā mehānisku *in vivo* skrīninga testu androgēniem agonistiem, androgēniem antagonistiem un 5α reduktāzes inhibitoriem, un tas būtu jāskata saistībā ar "ESAO konceptuālo pamatdokumentu: endokrīnās sistēmas darbības traucējumus izraisošu vielu testēšana un

▼M5

novērtēšana” (2. papildinājums). Minētajā konceptuālajā pamatdokumentā Heršbergera biotests ir iekļauts 3. līmenī kā *in vivo* tests, kas sniedz informāciju par atsevišķu endokrīnās sistēmas mehānismu, t. i., (anti)estrogenitāti. Heršbergera biotestu ir paredzēts iekļaut *in vitro* un *in vivo* testu sērijā, lai identificētu ķīmiskas vielas, kas var ietekmēt endokrīnās sistēmas darbību, un tas vajadzīgs, lai veiktu bīstamības un riska novērtējumu attiecībā uz cilvēku veselību vai vidi.

4. Pamatojoties ar dzīvnieku labturības apsvērumiem attiecībā uz kastrācijas procedūru, metode ar neskartiem (nekastrētiem), stimulētiem, atšķirtiem tēviņiem tika izmantota kā alternatīva Heršbergera biotestam, lai tie nebūtu jākastrē. Testēšanas metode, kurā izmanto stimulēto atšķiršanu, tika apstiprināta (24), tomēr validācijas pētījumos Heršbergera biotestā atšķiršanai nevarēja vienmēr noteikt, kā to orgānu svaru, uz kuriem iedarbojas androgēns, ietekmē vāji antiandrogēni testētajās devās. Tāpēc tā netika iekļauta šajā testēšanas metodē. Tomēr, tā kā tās izmantošana var būt ne tikai saistīta ar dzīvnieku labturību, bet var arī sniegt informāciju par citiem rīcības veidiem, tā ir aprakstīta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 115 (25).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Androgēna agonisti un antagonisti darbojas kā androgēna receptoru ligandi, un tie var attiecīgi aktivizēt vai nomākt gēnu transkripciju, ko kontrolē receptors. Turklāt dažas ķīmiskas vielas kavē testosterona pārvēršanos spēcīgākā dabiskajā androgēna dihidrotestosteronā dažos androgēnos mērķaudos (5α reduktāzes inhibitori). Minētās ķīmiskās vielas var radīt negatīvu veselības apdraudējumu, tostarp attiecībā uz reprodukciju un attīstību. Tāpēc ir vajadzīgs regulējums, lai varētu ātri izskatīt un novērtēt ķīmisko vielu kā iespējamo androgēna agonistu vai antagonistu vai 5α reduktāzes inhibitoru. Androgēna receptora liganda afinitāte, ko mēra ar receptora saistvielām, vai ziņotājgēnu transkripcijas aktivizēšanās *in vitro* sniedz datus, tomēr tas nav vienīgais veids, kā noteikt iespējamo apdraudējumu. Citi veidi ir, piemēram, metaboliska aktivēšanās un dezaktivēšanās, vielai iekļūstot ķermenī, ķīmiskās vielas izplatīšanās mērķaudos un izdalīšanās no organisma. Tas nozīmē, ka ir jāpārbauda ķīmiskās vielas iespējamā aktivitāte *in vivo* noteiktos apstākļos un ekspozīcijā. *In vivo* novērtējums nav tik kritisks, ja ir zināmas ķīmiskās vielas īpašības attiecībā uz uzsūkšanos – izplatīšanos – metabolismu – izdalīšanos. Ja audus, uz kuriem iedarbojas androgēns, stimulē ar androgēniem, jo īpaši kastrētiem žurku tēviņiem pirmspubertātes vecumā, tie ātri un stabili aug. Grauzēju sugas, jo īpaši žurkas, arī bieži izmanto toksicitātes pētījumos bīstamības raksturošanai. Tāpēc testēšanas veids, kurā izmanto kastrētas žurkas pirmspubertātes vecumā un piecus mērķaudus šajā testēšanā, ir atbilstošs *in vivo* androgēna agonistu un antagonistu un 5α reduktāzes inhibitoru skrīningam.

6. Šīs testēšanas metodes pamatā ir ESAO validācijas pētījumā izmantotie protokoli, kas apliecināja, ka laboratorijas un starplaboratoriju pētījumu rezultāti ir ticami un atkārtojami (4)(5)(6)(7)(8). Šajā testēšanas metodē izmanto androgēnas un antiandrogēnas procedūras.

7. Lai gan ESAO Heršbergera biotesta validācijas programmā, kur piedalījās dažādas laboratorijas, lai atklātu antiandrogēnu, tika izmantotas nedaudz atšķirīgas TP devas (0,2 un 0,4 mg uz kg dienā, zemādas injekcija), šie divi protokolu varianti maz atšķīrās attiecībā uz spēju noteikt vāju vai spēcīgu antiandrogēnu aktivitāti. Tomēr ir skaidrs, ka TP deva nedrīkst būt pārāk augsta, lai nekavētu vāja androgēna receptora (AR) ietekmi, vai pārāk zema, lai nebūtu tā, ka androgēnie audi aug lēni pat tad, ja nav ievadīts antiandrogēns.

▼M5

8. Atsevišķu androgēnatkarīgu audu augšanu neietekmē tikai androgēns, t. i., noteiktu audu svaru var ietekmēt ķīmiskās vielas, kas nav androgēna agonisti. Tomēr vairākos audos augšanas atbildes reakciju vienlaikus ietekmē vairāk androgēnam specifisks mehānisms. Piemēram, spēcīga estrogēna augstas devas ietekmē var pieaugt sēklas pūslīšu svars, tomēr citi androgēnatkarīgie audi testā reaģē citādi. Antiandrogēniskas ķīmiskās vielas var darboties kā androgēna receptoru antagonisti vai 5α reduktāzes inhibitori. 5α reduktāzes inhibitori var iedarboties dažādi, jo dažādos audos atšķirīgi notiek pārveidošanās par spēcīgāko dihidrotestosteronu. Antiandrogēni, kas nomāc 5α reduktāzi, piemēram, finasterīds, salīdzinājumā ar spēcīgu AR antagonistu, piemēram, flutamīdu, vairāk ietekmē vēdera prostatu nekā citus audus. Audu atšķirīgo reakciju var izmantot, lai AR izraisīto atbildes reakciju atšķirtu no 5α reduktāzes izraisītās reakcijas. Turklāt androgēna receptors ir evolucionāri saistīts ar citu steroīdhormonu receptoru, un daži citi hormoni, tos ievadot lielās devās, kas pārsniedz fizioloģisko devu, var saistīt TP un kavēt tā ietekmi uz augšanu (13). Turklāt iespējams, ka pastiprināts steroīdu metabolisms un ar to saistīta seruma testosterona samazināšanās var kavēt androgēnatkarīgo audu augšanu. Tāpēc Heršbergera biotesta pozitīvie rezultāti vienmēr ir jānovērtē, izmantojot zinātnisko datu nozīmīguma pieeju, tostarp *in vitro* testus, piemēram, AR un estrogēna receptoru (ER) saistīšanas testus un atbilstošās transkripcijas aktivēšanas testus, vai izmantojot citus *in vivo* testus, kuros pārbauda līdzīgus androgēna mērķaudus, piemēram, tēviņu pubertātes tests, 15 dienu tests ar neskartiem pieaugušiem tēviņiem vai 28 dienu vai 90 dienu atkārtotas devas pētījumi.

9. Pieredze liecina, ka ksenobiotiski androgēni ir sastopami retāk nekā ksenobiotiski antiandrogēni. Attiecīgi sagaidāms, ka Heršbergera biotestu izmantos galvenokārt antiandrogēnu skrīningam. Tomēr androgenitātes testēšanas procedūru var izmantot steroīdiem vai steroīdiem līdzīgām ķīmiskām vielām vai ķīmiskām vielām, kurām iespējamā androgēnu ietekme tika noteikta, izmantojot konceptuālā pamatdokumenta 1. vai 2. līmenī minētās metodes (2. papildinājums). Turklāt ar (anti)androgēniskām īpašībām saistītu negatīvu ietekmi var novērot 5. līmeņa testos, un tādā gadījumā var būt jānosaka tas, vai ķīmiskās vielas ietekme ir endokrīniska.

10. Ir atzīts, ka visām procedūrām, kas saistītas ar dzīvniekiem, ir jāatbilst vietējiem dzīvnieku labturības standartiem; turpmāk tekstā minētie labturības un testu nosacījumi ir minimālie standarti, un tos aizstāj ar vietējiem noteikumiem, piemēram, Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvu 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (26). ESAO ir izdevusi arī citus norādījumus par humānu izturēšanos pret dzīvniekiem (17).

11. Kā jebkurā biotestā ar eksperimenta dzīvniekiem ir rūpīgi jāizvērtē vajadzība veikt attiecīgo pētījumu. Parasti tam var būt divi iemesli:

— liela ekspozīcijas iespējamība (konceptuālā pamatdokumenta 1. līmenis) vai (anti)androgenitātes pazīmes *in vitro* testēšanā (2. līmenis) – lai noskaidrotu, vai šāda ietekme ir iespējama *in vivo*,

— ietekme atbilst (anti)androgēnitātei *in vivo* testu 4. vai 5. līmenī, pamatojot konkrētā iedarbības veida izmeklēšanu, piemēram, lai noteiktu, vai ietekme ir saistīta ar (anti)androgēnisku mehānismu.

▼M5

12. Šajā testēšanas metodē minētās definīcijas ir minētas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

13. Heršbergera biotesta jutību nodrošina, izmantojot tēviņus, kuriem vāji veidojas endogēnais androgēns. Šajā nolūkā izmanto kastrētus tēviņus, nodrošinot attiecīgu laiku pēc kastrācijas, lai mērķaudi saruktu līdz minimumam, un izmanto arī kopīgu svara izejlielumu. Tādā gadījumā, pārbaudot iespējamo androgēno aktivitāti, endogēnais cirkulācijas androgēna līmenis ir zems, hipotalāma, hipofīzes un gonādas ass ir veidota tā, lai nevarētu kompensēt ar atbildes reakcijas mehānismiem, audu atbildes reakcijas spēja ir maksimāli palielināta un sākotnējā audu svara mainīgums ir minimāls. Iespējamās antiandrogēniskās darbības skrīningā var nodrošināt stabilāku audu svara pieaugumu, audus stimulējot ar androgēna standartvielu. Tas nozīmē, ka Heršbergera biotestam ir vajadzīgi tikai 6 dzīvnieki vienā devas grupā, bet citos testos, kur izmanto neskartus pieaugušus tēviņus vai tēviņus pubertātes vecumā, ir jāizmanto 15 tēviņi vienā devas grupā.

14. Žurku tēviņi pubertātes sākumposmā ir atbilstīgi jākastrē, izmantojot apstiprinātu anestēzijas un sterilizācijas metodi. Sāpju mazināšanas līdzekli ievada pirmās dažas dienas pēc operācijas, lai pēc tās mazinātu diskomfortu. Kastrācija uzlabo testa precizitāti vāju androgēnu un antiandrogēnu noteikšanā, likvidējot kompensējošos endokrīnos atbildes reakcijas mehānismus, kas piemīt neskartiem dzīvniekiem un var mazināt ievadīto androgēnu un antiandrogēnu ietekmi, un ierobežojot lielo seruma testosterona līmeņa mainību, kas vērojama atsevišķiem indivīdiem. Tādējādi kastrācija samazina to dzīvnieku skaitu, kas jāpārbauda, lai novērtētu endokrīno aktivitāti.

15. Iespējamās androgēniskās darbības skrīningā testējamo ķīmisko vielu ievada katru dienu ar mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju desmit dienas pēc kārtas. Testējamās ķīmiskās vielas ievada ne mazāk kā divām eksperimenta dzīvnieku grupām, kurām ievada vielu, vienai grupai izmantojot vienu devas līmeni. Dzīvniekiem izdara autopsiju apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas. Ja, salīdzinot ar nesējvielas kontroles grupu, pārbaudāmās vielas grupās ir konstatēts divu vai vairāku mērķorgānu svara statistiski nozīmīgs pieaugums, tad uzskatāms, ka rezultāts attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas androgēno darbību ir pozitīvs (sk. 60. punktu). Androgēni, piemēram, trenbolons, uz ko neiedarbojas 5α reduktāze, vairāk ietekmē *LABC* muskuli un dzimumlocekļa galviņu (*GP*), nekā TP, tomēr būtu jāpieaug visu audu svaram.

16. Pārbaudot iespējamo antiandrogēnisko darbību, testējamo ķīmisko vielu ievada katru dienu ar mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju desmit dienas pēc kārtas, TP dienas devu (0,2 vai 0,4 mg uz kg dienā) ievadot ar injekciju. Validācijas programmā tika noteikts, ka TP var izmantot 0,2 vai 0,4 mg uz kg dienā, jo abas minētās devas var izmantot antiandrogēnu noteikšanai, un tāpēc testēšanā ir jāizmanto tikai viena no minētajām devām. Testējamās ķīmiskās vielas pakāpeniskas devas ievada ne mazāk kā trīs eksperimenta dzīvnieku grupām, vienai grupai izmantojot vienu devas līmeni. Dzīvniekiem izdara autopsiju apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas. Ja testējamās ķīmiskās vielas grupās un TP grupās salīdzinājumā ar TP kontroles grupu ir konstatēts divu vai vairāku mērķorgānu svara statistiski nozīmīgs samazinājums, tad rezultāts attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas iespējamo antiandrogēnisko darbību ir pozitīvs (sk. 61. punktu).

▼M5

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas un līnijas izvēle

17. Heršbergera biotestā žurkas izmanto kopš 20. gs. 30. gadiem. Lai gan bioloģiski ticams, ka atbildes reakcija žurkām un pelēm būtu līdzīga, ņemot vērā 70 gadu pieredzi testos ar žurkām, tieši tās parasti izmanto Heršbergera biotestā. Turklāt Heršbergera biotesta datus var izmantot kā sākotnējos datus ilgtermiņa pētījumam, kas aptver vairākas paaudzes, tādējādi abos pētījumos var izmantot vienas sugas, līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

18. Izmantojot šo protokolu, laboratorijas var izvēlēties, kuru žurku līniju izmantot testēšanā, un parasti izvēlas to, kuru iesaistītā laboratorija izmanto vēsturiski. Var izmantot parastās laboratorijas žurku līnijas, tomēr nav ieteicams izmantot tādu līniju žurkas, kas nobriest ievērojami vēlāk nekā 42 dienas pēc dzimšanas, jo minēto žurku tēviņu kastrēšana 42 dienu vecumā var kavēt dzimumlocekļa galviņas svara mērīšanu, ko var darīt tikai tad, kad ir atdalījusies dzimumlocekļa priekšāda. Tas nozīmē, ka nav vēlams izmantot žurku līnijas, kas iegūtas no *Fisher* 344 žurkām, izņemot retus gadījumus. Līnijas *Fisher* 344 žurku reproduktīvās sistēmas orgānu attīstības laiks atšķiras no citām biežāk izmantotām žurku līnijām, piemēram, *Sprague Dawley* vai *Wistar* (16). Ja jāizmanto minētā žurku līnija, laboratorijā žurkas jākastrē mazliet vecākas un jāvar pierādīt izmantotās līnijas jutību. Laboratorijai ir skaidri jāpamato žurku līnijas izvēle. Ja skrīninga testu veic pirms vairākkārtējās devas perorāla pētījuma, pētījuma par reproduktiju un attīstību vai ilgtermiņa pētījuma, ieteicams visos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšanas un barošanas apstākļi

19. Visām procedūrām ir jāatbilst visiem vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Šeit sniegtie labturības un testu nosacījumi ir minimālie standarti, un lielāks spēks ir stingrākiem vietējiem noteikumiem, piemēram, Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvai 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (26). Eksperimenta dzīvnieku telpas temperatūrai jābūt 22 °C (ar nobīdi ± 3 °C). Relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, ieteicams, ne vairāk kā 70 %, izņemot uzkopšanas laiku. Vēlamais relatīvais mitrums ir 50–60 %. Telpās ir jābūt mākslīgajam apgaismojumam. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā.

20. Vēlams dzīvniekus turēt grupās, nevis atsevišķi, jo dzīvnieki ir jauni, un žurkas ir sociāli dzīvnieki. Ja būrī ir divi vai trīs dzīvnieki, tad būris nav pārpildīts un netiek radīts stress, kas var ietekmēt dzimumorgānu sistēmas akcesoro audu attīstības hormonālo kontroli. Būrus rūpīgi iztīra, lai likvidētu iespējamus kontaminētājus, un tos izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Jāizmanto pienācīga izmēra būri (apmēram 2 000 kvadrātcentimetri), lai tie nebūtu pārpildīti.

21. Visi dzīvnieki ir humānā viedā atsevišķi jāidentificē (piemēram, marķējums uz auss vai krotālija). Identifikācijas veidu dokumentē.

▼M5

22. Laboratorijas dzīvnieku barību un dzeramo ūdeni dzīvnieki saņem *ad libitum*. Laboratorijām, kas izmanto Heršbergera biotestu, ir jāizmanto laboratorijas dzīvnieku barība, ko parasti izmanto ķīmiskās vielas testēšanā. Biotesta validācijas pētījumos netika konstatēta ar barību saistīta ietekme vai mainība. Izmantoto barību dokumentē un laboratorijas dzīvnieku barības paraugu saglabā, lai turpmāk vajadzības gadījumā to varētu analizēt.

Veiktspējas kritēriji attiecībā uz androgēnatkarīgu orgānu svaru

23. Validācijas pētījumā netika konstatēts, ka ķermeņa svara samazinājums ietekmē mērķaudu (t. i., šajā pētījumā sveramo audu) svara pieaugumu vai samazinājumu.

24. Salīdzinot dažādas žurku līnijas, kas veiksmīgi izmantotas validācijas programmā, androgēnatkarīgie orgāni ir lielāki smagākām žurku līnijām nekā vieglākām līnijām. Tāpēc Heršbergera biotesta norises kritērijos nav norādīts absolūtais paredzamais orgānu svars pozitīvās un negatīvās kontroles dzīvniekiem.

25. Tā kā audiem variācijas koeficients (CV) ir apgriezti proporcionālā sakarībā ar statistisko jaudu, Heršbergera biotesta veiktspējas kritēriju pamatā ir variācijas koeficienta maksimālās vērtības katriem audiem (1. tabula). Variācijas koeficientu nosaka ESAO validācijas pētījumos. Negatīva rezultāta gadījumā laboratorijām ir jāpārbauda variācijas koeficients kontroles grupā un augstākās devas grupā, lai noteiktu, vai ir pārsniegti maksimālā variācijas koeficienta veiktspējas kritēriji.

26. Pētījumu atkārto šādos gadījumos: 1) trīs vai vairāk no desmit iespējamiem atsevišķiem variācijas koeficientiem kontroles grupā un augstākās devas grupā pārsniedz maksimālo daudzumu, kas noteikts pētījumiem ar agonistiem un antagonistiem, kā norādīts 1. tabulā, un 2) vismaz divi mērķaudi ir gandrīz nenozīmīgi, t. i., ρ vērtības no 0,05 līdz 0,10.

1. tabula

Maksimālie pieļaujamie variācijas koeficienti, kas noteikti dzimumorgānu sistēmas akcesorajiem mērķaudiem, ESAO validācijas pētījumos lietojot modeli, kurā izmanto kastrētus dzīvniekus ([1])

Audi	Antiandrogēniska ietekme	Androgēniska ietekme
Sēklas pūslīši	40 %	40 %
Vēdera prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Kupera dziedzeri	35 %	55 %
Dzimumlocekļa galviņa	17 %	22 %

([1]) Minēto audu variācijas koeficienta robežvērtība iegūta no grafika, kurā apkopotas variācijas koeficienta vērtības, kas secīgi sagrupētas no zemākās līdz augstākajai, visiem veidiem un visiem validācijas procesa eksperimentiem, izmantojot speciālu modeli (agonisti vai antagonisti). Variācijas koeficienta robežvērtība bija punkts, kurā solis līdz nākamajam lielākajam variācijas koeficientam ir ievērojami lielāks nekā dažu iepriekšējo variācijas koeficientu vidū – "lūzumpunkts". Jāņem vērā, ka, lai gan attiecībā uz testēšanas antagonistu modeli šajā analīzē tika konstatēti relatīvi ticami "lūzumpunkti", agonistu testēšanas variācijas koeficienta līknes apliecināja vienmērīgāku pieaugumu, un tāpēc minētajam modelim variācijas koeficienta sliekšņa noteikšana ar šo metodi ir diezgan patvaļīga.

▼M5

PROCEDŪRA

Atbilstība regulējumam un laboratorijas verifikācija

27. Atšķirībā no uterotropās testēšanas (šā pielikuma B.54. nodaļa), pirms Heršbergeratesta veikšanas nav jāapliecina laboratorijas kompetence, jo vienlaicīgās pozitīvās (testosterona propionāts un flutamīds) un negatīvās kontroles ir testa neatņemama daļa.

Dzīvnieku skaits un stāvoklis

28. Katrā apstrādes un kontroles grupā jābūt ne mazāk kā 6 dzīvniekiem. Tas attiecas uz androgēnu un antiandrogēnu protokoliem.

Kastrācija

29. Lai dzīvnieki būtu veseli un augtu, pēc to saņemšanas ir jānodrošina dažas dienas ilgs aklimatizācijas periods. Tā kā dzīvniekiem, kas ir kastrēti agrāk nekā 42 dienu vecumā jeb 42. dienā pēc piedzimšanas, var nebūt preputiālās atdalīšanās, dzīvnieki ir jākastrē 42. dienā pēc piedzimšanas vai vēlāk, nevis agrāk. Dzīvniekus kastrē, izmantojot anestēziju, izdarot iegriezumu sēklinieku maisiņā un izņemot abus sēkliniekus un sēklinieku piedēkļus, asinsvadus un sēklas vadus liģējot. Pārliecinoties, ka nav asiņošanas, sēklinieku maisiņu aizšuj vai brūcei uzliek skavas. Pirmās dažas dienas pēc operācijas, lai mazinātu diskomfortu, dzīvniekiem ievada pretsāpju līdzekli. Ja no dzīvnieku piegādātāja iegādājas kastrētus dzīvniekus, piegādātājam ir jānorāda dzīvnieku vecums un dzimumbrieduma stadija.

Aklimatizācija pēc kastrācijas

30. Dzīvniekiem pēc kastrācijas ir jānodrošina vismaz 7 dienu ilgs aklimatizācijas periods laboratorijā, lai mērķaudu svars saruktu. Dzīvnieki katru dienu ir jānovēro, un ir jālikvidē dzīvnieki, kam ir redzamas slimības vai fiziskās kroplības. Tas nozīmē, ka (pētījuma) devu var sākt dot, sākot ar 49. dienu pēc piedzimšanas, bet ne vēlāk kā 60. dienā pēc piedzimšanas. Autopsiju drīkst veikt ne vēlāk kā 70. dienā pēc piedzimšanas. Laika ierobežojumi ir tik elastīgi, lai laboratorija varētu efektīvi plānot eksperimentus.

Ķermeņa svars un grupu nejaušināšana

31. Audu svara mainību dzīvniekiem vienā grupā un dažādās grupās ietekmē individuālā ķermeņa svara atšķirības. Palielinoties audu svara mainībai, palielinās variācijas koeficients un samazinās testēšanas statistiskā jauda (tā dēvētais testu jutīgums). Tāpēc ķermeņa svara izmaiņas ir jākontrolē gan eksperimentā, gan ar statistikas metodēm.

32. Kontrole eksperimentā nozīmē tikai nelielas ķermeņa svara izmaiņas vienā pētījuma grupā un dažādās grupās. Pārāk mazus vai pārāk lielus dzīvniekus neizmanto un neiekļauj pētījuma grupā. Uzsākot pētījumu, izmantoto dzīvnieku ķermeņa svaram mainībai jābūt ± 20 % no vidējā svara (piemēram, 175 g ± 35 g kastrētām žurkām pubertātes sākumposmā). Dzīvnieki ir jāiedala grupās (kontroles un vielas ievadīšanas grupā) tās pēc svara sadalot nejaušināti, lai katras grupas vidējais ķermeņa svars statistiski neatšķirtos no otras grupas. Jādokumentē izmantotā blokotas nejaušināšanas procedūra.

▼M5

33. Tā kā toksicitāte var samazināt izmēģinājumu grupu dzīvnieku ķermeņa svaru attiecībā pret kontroles grupu, par statistisko kovariācijas vērtību var izmantot ķermeņa svaru pirmajā testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas dienā, nevis ķermeņa svaru autopsijas brīdī.

Dozējums

34. Lai noteiktu, vai testējamajai ķīmiskajai vielai var būt androgēniska iedarbība *in vivo*, parasti pietiek ar divām vielas ievadīšanas un kontroles grupām un pozitīvo un nesējvielas (negatīvo) kontroles grupu (sk. 3. punktu), un tāpēc dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ šo modeli izmanto visbiežāk. Ja mērķis ir iegūt līkni, kas raksturo atbildes reakciju uz devu vai veikt ekstrapolāciju uz mazākām devām, ir vajadzīgas vismaz 3 devu grupas. Ja ir vajadzīga papildu informācija, nevis tikai par to, vai ir androgēniska darbība (piemēram, noteikt stiprumu), ir jāizmanto cits devu došanas režīms. Testējot antiandrogēnus, testējamo ķīmisko vielu ievada kopā ar androgēna agonista standartvielu. Ir jāizmanto vismaz 3 testa grupas ar dažādu testējamās ķīmiskās vielas devu un pozitīvās un negatīvās kontroles grupa (sk. 44. punktu). Ar kontroles dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar nesējvielu, kontroles grupa saņem maksimālo nesējvielas tilpumu, ko izmanto testa grupām.

35. Devu līmeņi jāierosina un jāizvēlas, ņemot vērā esošos toksicitātes un (toksisko-)kinētikas datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai par radniecīgiem materiāliem. Izvēloties augstāku devas līmeni, vispirms ir jāņem vērā LD_{50} un/vai informācija par pārbaudāmās vielas akūto toksicitāti, lai neizraisītu dzīvnieku nāvi, smagas ciešanas vai diskomfortu (17)(18)(19)(20), un ir jāņem vērā pieejamā informācija par devām, ko izmanto subhroniskos un hroniskos pētījumos. Parasti augstākā deva nedrīkst izraisīt dzīvnieku galīgā ķermeņa svara samazinājumu vairāk nekā par 10 % no kontrolsvara. Atkarībā no tā, kura no turpmāk minētajām devām ir zemāka, augstākā deva ir: 1) augstākā deva, pie kuras dzīvnieki izdzīvo un kura tiem nerada ievērojamu toksicitāti vai diskomfortu, to 10 dienas pēc kārtas ievadot līdz maksimālajai devai 1 000 mg uz kg dienā (sk. 36. punktu) vai 2) deva, kas izraisa (anti)androgēnisku ietekmi. Skrīninga gadījumā parasti izmanto lielus devu intervālus, piemēram, intervāla vienības puse log (devas progresijā 3,2), vai pat viens log. Ja piemēroti dati nav pieejami, izmantojamo devu noteikšanai var izdarīt diapazona atrašanas pētījumu (37. punkts).

Robeždeva

36. Ja testā pie robeždevas, kas ir 1 000 mg uz kg no ķermeņa svara dienā, un mazākās devas, izmantojot šā pētījuma procedūras, nav izraisītas statistiski nozīmīgas reproduktīvo orgānu izmaiņas, nevajag ievadīt augstāku devu. Robeždevu izmanto, izņemot gadījumus, kur dati par cilvēku ekspozīciju liecina, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis.

Apsvērumi par diapazona noteikšanu

37. Vajadzības gadījumā pirms tam dažiem dzīvniekiem var veikt diapazona noteikšanas priekšpētījumu, lai pareizi izraudzītos devu grupas [izmantojot akūtā toksiskuma noteikšanas metodes (šā pielikuma B.1.a un B.1.b sadaļa (27), ESAO Testēšanas norādījumi 425 (*TG*) (19))]. Heršbergera biotesta gadījumā mērķis ir izraudzīties tādas devas, lai dzīvnieki izdzīvotu un lai tiem nerastos ievērojama toksicitāte vai diskomforts, desmit dienas pēc

▼M5

kārtas ievadot ķīmisko vielu līdz robeždevai 1 000 mg/kg dienā, kā noteikts 35. un 36. punktā. Šajā saistībā var izmantot ESAO Norādījumu dokumentu (17), kurā noteiktas klīniskās pazīmes, kas liecina par dzīvnieku toksicitāti vai diskomfortu. Ja iespējams, minētajā diapazona noteikšanas pētījumā pēc tam, kad pārbaudāmā viela ir ievadīta desmit dienas, mērķaudus var izgriezt un nosvērt apmēram 24 stundas pēc pēdējās devas ievadīšanas. Pēc tam datus var izmantot, lai izraudzītos devas galvenajā pētījumā.

Ķīmiskās standartvielas un nesējviela

38. Androgēna agonista standartviela ir testosterona propionāts (TP), *CAS* Nr. 57-82-5. TP standartvielas deva ir 0,2 mg uz kg no dzīvnieka svara dienā vai 0,4 mg uz kg no dzīvnieka svara dienā. Androgēna antagonista standartviela ir flutamīds (FT), *CAS* Nr. 1311-84-7. FT standartvielas deva ir
3 mg uz kg no dzīvnieka svara dienā, un FT ievada kopā ar TP standartvielas devu.

39. Ja vien iespējams, ieteicams lietošanai izraudzīties šķīdumu/suspensiju uz ūdens bāzes. Bet tā kā daudzi androgēna ligandi vai to metaboliskie priekšteči ir hidrofobi, parasti izmanto eļļas (piemēram, kukurūzas, zemesriekstu vai sezama eļļas vai olīveļļas) šķīdumu/suspensiju. Testējamo ķīmisko vielu var izšķīdināt minimālā daudzumā 95 % etanola šķīduma vai cita atbilstoša šķīdinātāja un līdz galīgajai darba koncentrācijai atšķaidīt testa nesējvielā. Ir jāzina šķīdinātāja toksiskās īpašības, un tām jābūt testētām atsevišķā kontroles grupā, kurai izmanto tikai šķīdinātāju. Ja testējamā ķīmiskā viela ir stabila, tās šķīdināšanā var izmantot vieglu sildīšanu un spēcīgu mehānisku iedarbību. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte nesējvielā. Ja visu pētījuma laiku testējamā ķīmiskā viela ir stabila, var sagatavot vienu testējamās ķīmiskās vielas sākuma alikvotu un katru dienu sagatavot devas atšķaidījumus pēc specifikācijām, rīkojoties piesardzīgi, lai paraugus nekontaminētu un nesabojātu.

Devu ievadīšana

40. TP ievada ar zemādas injekciju, un FT ievada ar mākslīgo barošanu.

41. Testējamo ķīmisko vielu ievada, izmantojot mākslīgo barošanu vai zemādas injekciju. Izvēloties devas ievadīšanas ceļu, ir jāņem vērā dzīvnieku labturības apsvērumi un testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības. Pirms sākt vērienīgu ilgtermiņa testēšanu gadījumā, ja ar injekciju iegūti pozitīvi rezultāti, ir jāņem vērā tādi toksikoloģiskie aspekti kā iespējamais cilvēka ekspozīcijas ceļš (piemēram, ar mākslīgo barošanu modelē vielas nonākšanu barības vadā, ar zemādas injekciju modelē ieelpošanu vai adsorbciju no ādas) un esošā toksikoloģiskā informācija un dati par metabolismu un kinētiku (piemēram, konkrēts ceļš dod iespēju izvairīties no priekšlaicīga metabolisma, nodrošina labāku efektivitāti).

42. Dzīvniekiem devu ievada vienā veidā un ar vienādu laika intervālu desmit dienas pēc kārtas ik pēc apmēram 24 stundām. Devas līmeni katru dienu koriģē, ņemot vērā ķermeņa svaru, ko mēra katru dienu. Katru dienu dokumentē devas tilpumu un ekspozīcijas laiku. Jāraugās, lai nepārsniegtu maksimālo devu, kā noteikts 35. punktā, lai datus varētu statistiski interpretēt. Šajā ziņā ir rūpīgi jānovērtē ķermeņa svars, klīniskās pazīmes un citi konstatējumi. Ievadot vielu ar mākslīgo barošanu, izmanto kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas kanulu. Maksimālais šķidruma daudzums, ko vienā

▼M5

reizē var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Ir jāievēro vietējie noteikumi dzīvnieku labturības jomā, taču tilpums nedrīkst pārsniegt 5 ml uz kg no ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumus, ko var ievadīt 10 ml uz kg no ķermeņa svara. Attiecībā uz zemādas injekcijām devu ievada muguras, plecu vai jostasvietas zonā, izmantojot sterilu adatu (piemēram, 23. vai 25. izmērs) un turbekulīna šļirci. Injekcijas vietu var nenoskūt. Vielas zudumi, noplūdes injekcijas vietā vai nepilnīga devas ievadīšana ir jāreģistrē. Kopējais tilpums, ko injicē žurkai dienā, nedrīkst pārsniegt 0,5 ml uz kg ķermeņa svara.

Speciālās procedūras attiecībā uz androgēna agonistiem

43. Ja pārbauda androgēna agonistus, nesējviela ir negatīvā kontrole, un grupa, kurai ievada TP, ir pozitīvā kontrole. Bioloģisko darbību, kas atbilst androgēna agonistiem, pārbauda, ievadot testējamās ķīmiskās vielas izraudzīto devu grupas dzīvniekiem 10 dienas pēc kārtas. Salīdzina piecu dzimumorgānu sistēmas akcesoro mērķaudu svaru testējamās ķīmiskās vielas grupām un nesējvielas grupai, lai konstatētu, vai vērojams statistiski nozīmīgs svara pieaugums.

Speciālās procedūras attiecībā uz androgēna antagonistiem un 5α reduktāzes inhibitoriem

44. Ja testē androgēna antagonistus un 5α reduktāzes inhibitorus, grupa, kurai ievada TP, ir negatīvā kontrole, un grupa, kurai ievada arī TP un FT standartvielas devu, ir pozitīvā kontrole. Bioloģisko darbību, kas atbilst androgēna antagonistiem un 5α reduktāzes inhibitoriem, pārbauda, ievadot TP standartvielas devu un ievadot testējamo ķīmisko vielu 10 dienas pēc kārtas. Salīdzina piecu dzimumorgānu sistēmas akcesoro mērķaudu svaru grupām, kurām ievada TP un testējamo ķīmisko vielu, un grupai, kurai ievada tikai TP standartvielu, lai konstatētu, vai vērojams statistiski nozīmīgs svara samazinājums.

NOVĒROJUMI

Klīniskie novērojumi

45. Vispārīgi klīniskie novērojumi ir jāveic vismaz reizi dienā un biežāk, ja ir konstatētas toksicitātes pazīmes. Novērojumi katru dienu jāizdara vienā un tai pašā laikā, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc devu došanas. Visi dzīvnieki jānovēro attiecībā uz mirstību, saslimstību un vispārīgām klīniskām pazīmēm, piemēram, izmaiņām uzvedībā, ādā, apmatojumā, acīs, gļotādā, attiecībā uz sekrēciju un izdalījumiem un veģetatīvo aktivitāti (piemēram, asarošanu, piloerekciju, acs zīlītes diametru un neraksturīgu elpošanu).

46. Visus dzīvniekus, kas testēšanas laikā ir nobeigušies, izņem un likvidē, neveicot datu analīzi. Visi dzīvnieki, kas nobeigušies pirms autopsijas, ir jāiekļauj pētījuma dokumentējumos, norādot acīmredzamo nobeigšanās iemeslu. Visi mirstošie dzīvnieki ir humāni jānonāvē. Visi mirstoši un pēc tam humāni nonāvēti dzīvnieki ir jāiekļauj pētījuma ziņojumā, norādot acīmredzamo saslimstības iemeslu.

▼M5

Ķermeņa svars un barības patēriņš

47. Visi dzīvnieki jāsver katru dienu līdz tuvākajai 0,1 g vienībai, sākot ar brīdi tieši pirms pirmās devas ievadīšanas, t. i., kad dzīvnieki ir iedalīti grupās. Par izvēles mērījumu var izmantot arī barības patēriņu devu došanas laikā uz vienu būri, nosverot barības traukus. Barības patēriņa mērījumu rezultātus izsaka gramos uz vienu žurku dienā.

Secēšana un audu un orgānu svara noteikšana

48. Apmēram 24 stundas pēc testējamās ķīmiskās vielas pēdējās ievadīšanas reizes žurkas humāni nonāvē un nolaiž asinis saskaņā ar standartprocedūru, kas ir spēkā attiecīgajā laboratorijā, un veic autopsiju. Humānās nonāvēšanas veids ir jādokumentē laboratorijas pārskatā.

49. Ideālā gadījumā autopsija jāizdara pa grupām nejaušinātā kārtībā, lai secība nebūtu vienā vai otrā virzienā pa devu grupām, un tādējādi nebūtu nedaudz ietekmēti dati. Visi autopsijas rezultāti, t. i., patoloģiskas izmaiņas/skaidri redzami bojājumi, ir jāpieraksta un jānorāda pārskatā.

50. Ir jānosver pieci androgēnatkarīgie audi (VP, *SV*, *LABC*, Kupera dziedzeris, *GP*). Minētos audus izgriež, tiem uzmanīgi nogriež liekos audus un taukus, un nosaka to jauno svaru (bez fiksācijas). Ar visiem audiem darbojas ļoti uzmanīgi, lai neiztecētu šķidrums un lai tie neizžūtu, kas var radīt ievērojamu kļūdu un mainību mazāka reģistrētā svara dēļ. Daži audi var būt ļoti mazi vai tos var būt grūti secēt, un tas var palielināt mainību. Tāpēc ir svarīgi, lai personas, kas veic dzimumorgānu sistēmas akcesoro mērķaudu secēšanu, pārzinātu attiecīgo audu secēšanas standartprocedūru. Standartoperāciju procedūru (*SOP*) rokasgrāmata, kurā aprakstīts, kā veikt secēšanu, ir pieejama ESAO (21). Precīzi ievērojot *SOP* norādījumus, pētījumā mazināsies variāciju iespēja. Ideālā gadījumā par attiecīgā veida audu secēšanu jābūt atbildīgam vienam prozektoram, lai audu apstrādes procesā nerastos individuālas atšķirības. Ja tas nav iespējams, autopsija jāplāno tā, lai katrs prozektors secētu viena veida audus visām devu grupām, nevis viens prozektors secētu visu veidu audus kontroles grupai, bet kāds cits – devu grupām. Visiem dzimumorgānu sistēmas akcesorajiem mērķaudiem nosaka natīvo svaru līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai un to dokumentē.

51. Daži audi var būt ļoti mazi vai tos var būt grūti secēt, un tas rada mainību. Pieredze liecina par variācijas koeficientu diapazonu, kas atšķiras atkarā no laboratorijas lietpratības. Dažreiz konkrētā laboratorijā var būt konstatētas dažu audu, piemēram, VP un Kupera dziedzera, absolūtā svara būtiskas atšķirības.

52. Aknu, nieru un virsnieru svars ir neobligāti mērījumi. Arī šiem audiem ir jānogriež liekās fascijas un liekie tauki. Aknas nosver un svaru dokumentē līdz tuvākajai 0,1 g vienībai, un nieres un virsnieres nosver un svaru dokumentē līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai. Uz aknām, nierēm un virsnierēm ne tikai iedarbojas androgēns, bet tās arī sniedz noderīgus sistēmiskās toksicitātes rādītājus.

▼**M5**

53. Seruma luteinizējošo hormonu (LH), folikulu stimulējošo hormonu (FSH) un testosteronu (T) mēra pēc izvēles. Seruma T līmeni ir svarīgi noteikt, ja testējamā ķīmiskā viela inducē testosterona metabolizēšanos aknās un samazina tā līmeni serumā. Ja T līmeni nenosaka, var izskatīties, ka tas notiek antiandrogēniska mehānisma ietekmē. Nosakot LH līmeni, var iegūt informāciju par antiandrogēna spēju ne tikai samazināt orgānu svaru, bet arī ietekmēt hipotalāma un hipofīzes funkcijas, kas ilgtermiņa pētījumā var radīt sēklinieku audzēju. FSH ir svarīgs spermatoģenēzes hormons. Seruma T4 un T3 mērījums arī ir neobligāti mērījumi, kas var sniegt noderīgu papildinformāciju par spēju traucēt vairogdziedzera hormona homeostāzi. Ja ir jāveic hormona mērījumi, pirms autopsijas žurkas iemidzina ar anestēziju, un, veicot sirds punktēšanu, nolaiž asinis, rūpīgi izvēloties anestēzijas veidu, lai tas neietekmētu hormona mērījumus. Jādokumentē seruma sagatavošanas veids, radioimunoloģiskā testa avots vai citi mērījumu komplekti, analīžu procedūras un rezultāti. LH līmeni dokumentē kā ng uz vienu mililitru seruma, un T arī izsaka ng uz vienu mililitru seruma.

54. Audu secēšana ir aprakstīta turpmāk tekstā, sniedzot sīki izstrādātus secēšanas norādījumus ar fotogrāfijām, kas publicētas kā validācijas programmas papildu materiāls (21). Korejas Pārtikas un zāļu pārvaldes tīmekļa vietnē ir arī pieejams secēšanas video (22).

— Dzīvniekam atrodoties guļus ar vēderu uz augšu, pārliecinās, vai dzimumlocekļa priekšāda ir atdalījusies no tā galviņas. Ja priekšāda ir atdalījusies, to atvelk un nogriež dzimumlocekļa galviņu, pēc tam to nosver (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai), un tās svaru reģistrē.

— Atver vēdera ādu un sienu, lai var redzēt iekšējos orgānus. Ja ir paredzēts svērt orgānus, par kuriem mērījumi nav obligāti, aknas izgriež un nosver līdz tuvākajai 0,1 g vienībai, izgriež kuņģi un zarnas, izgriež un nieres un virsnieres un tās nosver līdz tuvākajai 0,1 g vienībai. Šādi secējot, kļūst redzams pūslis un var sākt tēviņu dzimumorgānu sistēmas akcesoro mērķaudu secēšanu.

— Lai secētu VP, pūsli atdala no vēdera muskuļu slāņa, pa viduslīniju pārgriežot saistaudus. Uz priekšu virzienā uz sēklas pūslīšiem izņem urīnpūsli, atsedzot vēdera prostatas kreiso un labo puslodi (tās sedz tauku slānis). Uzmanīgi noņem taukus no vēdera prostatas labās un kreisās puslodes. Vēdera prostatas labo puslodi uzmanīgi atdala no urīnizvadkanāla un no tā nogriež. Joprojām pieturot vēdera prostatas labo puslodi, no urīnizvadkanāla uzmanīgi atdala vēdera prostatas kreiso puslodi un nogriež to no urīnizvadkanāla; nosver līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai un svaru reģistrē.

— Lai secētu *SVCG*, urīnpūsli izņem kaudāli, lai varētu redzēt sēklvadu, sēklas pūslīšu labo un kreiso puslodi un koagulācijas dziedzerus (*SVCG*). Lai šķidrums nenoplūstu, knaibles saspiež pie *SVCG* pamatnes, kur sēklvads savienojas ar urīnizvadkanālu. Uzmanīgi secē *SVCG*, kamēr knaibles ir saspiestas, nogriež taukus un liekos audus, ieliek *SVCG* svaru traukā, noņem knaibles un nosver līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai, un svaru reģistrē.

▼M5

— Lai secētu *LABC* muskuļus, atklāj muskuļus un dzimumlocekļa pamatni. Tūpļa cēlājmuskulis (*LA*) ir aptinies ap lokzarnu, bet iekšējais tūpļa cēlājmuskulis un priekštelpas sīpola un briedumķermeņa muskulis (*BC*) ir savienoti ar dzimumlocekļa sēkliniekiem. Nogriež ādu un liekos audus, kas atrodas perianālajā daļā no dzimumlocekļa pamatnes līdz anālās atveres priekšējai daļai. BC muskuļus pakāpeniski nogriež no dzimumlocekļa sēkliniekiem un audiem. Lokzarnu pārgriež un tad var izgriezt un izņemt visu *LABC*. *LABC* nogriež taukus un liekos audus, nosver līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai un svaru reģistrē.

— Kad *LABC* ir izgriezti, pie dzimumlocekļa sēkliniekiem un mazliet uz aizmuguri ir redzami apaļie Kupera dziedzeri jeb urīnizvadkanāla sīpoliņa dziedzeri. Jāgriež uzmanīgi, lai netrāpītu plānajai kapsulai un lai neiztecētu šķidrums. Nosver Kupera dziedzerus līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai, un svaru reģistrē.

— Ja autopsijas vai secēšanas laikā no dziedzera iztek šķidrums, tas jāreģistrē.

55. Ja ķīmiskās vielas izvērtēšanai secēšana ir jāveic vairāk dzīvniekiem, nekā vienā dienā, praktiski iespējams, pētījumu var sākt pakāpeniski divās secīgās dienās, un tādā gadījumā iespējama pakāpeniska autopsija un attiecīgie darbi divās dienās. Ja izmanto šādu pakāpeniskumu, vienā dienā izmanto pusi dzīvnieku no katras vielas ievadīšanas grupas.

56. Pēc autopsijas dzīvnieku ķermeņus atbilstoši likvidē.

REZULTĀTI

Dati

57. Datus pārskatā iekļauj par katru dzīvnieku (t. i., ķermeņa svars, dzimumorgānu sistēmas akcesoro audu svars, citi mērījumi un citas atbildes reakcijas un novērojumi) un par katru dzīvnieku grupu (visu veikto mērījumu vidējais rādītājs un standartnovirzes). Datus apkopo tabulā. Ir jānorāda dzīvnieku skaits testa sākumā, to dzīvnieku skaits, kas testa laikā ir nobeigušies, vai dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, un novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu.

58. Galīgajā pārskatā iekļauj šādu informāciju:

Testēšanas iekārta:

— iekārtas nosaukums, atrašanās vieta,

— pētījuma vadītājs un citi darbinieki un viņu pienākumi pētījumā,

— pētījuma sākuma un beigu datums, t. i., attiecīgi testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas pirmā diena un autopsijas pēdējā diena.

Testējamā ķīmiskā viela:

— avots, partijas/sērijas numurs, identitāte, tīrības pakāpe, testējamās(-o) ķīmiskās(-o) vielas(-u) piegādātāja pilna adrese un raksturojums,

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības,

— glabāšanas apstākļi un šķīdumu pagatavošanas veids un biežums,

— jebkādi apkopotie dati par stabilitāti,

— ievadāmā šķīduma/suspensijas analīze.

▼**M5**

Nesējviela:

— nesējvielas īpašības (identitāte, piegādātājs un partijas numurs),

— nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki un dzīvnieku audzēšanas procedūras:

— izmantotā suga/līnija un izvēles pamatojums,

— dzīvnieku izcelsme vai piegādātājs, norādot pilnas adreses,

— piegādāto dzīvnieku skaits un vecums,

— turēšanas apstākļi (temperatūra, apgaismojums un citi parametri),

— barība (nosaukums, veids, piegādātājs, partijas numurs, sastāvs un fitoestrogēna līmenis, ja zināms),

— guļvietas (nosaukums, veids, piegādātājs, sastāvs),

— būrī turēšanas apstākļi un dzīvnieku skaits vienā būrī.

Testa apstākļi:

— dzīvnieka vecums kastrācijas brīdī un aklimatizācijas ilgums pēc kastrācijas,

— katra dzīvnieka svars pētījuma sākumā (līdz tuvākajai 0,1 g vienībai),

— nejaušināšanas process un dokumentēts iedalījums pa nesējvielas, standartvielas un testējamās ķīmiskās vielas grupām un būriem,

— vidējais ķermeņa svars un standartnovirze katrā grupā katrā svēršanas dienā visu pētījuma laiku,

— izraudzīto devu pamatojums,

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas ceļš un ekspozīcijas ceļa izvēles pamatojums,

— antiandrogenitātes pētījuma gadījumā TP ekspozīcija (deva un tilpums),

— testējamās ķīmiskās vielas došana (deva un tilpums),

— devas došanas laiks,

— autopsijas procedūras, tostarp asiņu nolaišanas un anestēzijas veids,

— ja veic seruma analīzi, ir jānorāda izmantotās metodes sīks izklāsts. Piemēram, izmantojot *RIA*, ir jāreģistrē *RIA* procedūra, *RIA* komplekta izcelsme, komplekta derīguma termiņš, scintilāciju skaitīšanas procedūra un standartizācija.

Rezultāti:

— novērojumi attiecībā uz katru dzīvnieku katru dienu devas došanas laikā, tostarp:

— ķermeņa svars (līdz tuvākajai 0,1 g vienībai),

— klīniskās pazīmes (ja tādas ir),

— jebkādi mērījumi vai piezīmes par barības patēriņu.

— novērojumi attiecībā uz katra dzīvnieka autopsiju, arī:

▼M5

— autopsijas datums,

— eksperimenta grupa,

— dzīvnieka identifikācijas numurs,

— prozektors,

— autopsijas un secēšanas diennakts laiks,

— dzīvnieka vecums,

— galīgais ķermeņa svars autopsijas brīdī, reģistrējot jebkādu nozīmīgu pieaugumu vai samazinājumu,

— asiņu nolaišanas un secēšanas secība autopsijas laikā,

— to piecu mērķaudu svars, uz kuriem iedarbojas androgēns:

— vēdera prostata (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— sēklas pūslīši un koagulācijas dziedzeri, tostarp šķidrums (pāros, līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— *LABC* muskuļu komplekss (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— Kupera dziedzeri (svars bez fiksācijas – pāros, līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— dzimumlocekļa galviņa (svars bez fiksācijas līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai).

— citu audu svars neobligātajos mērījumos:

— aknas (līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— nieres (pāros, līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— virsnieres (pāros, līdz tuvākajai 0,1 mg vienībai),

— vispārīgas piezīmes un komentāri,

— seruma hormonu analīze, ja tāda veikta:

  — seruma LH (pēc izvēles – ng uz ml seruma), un

  — seruma T (pēc izvēles – ng uz ml seruma),

— vispārējas piezīmes un komentāri.

Datu apkopojums

Datus apkopo tabulā, norādot katras grupas parauga izlases lielumu, vidējo vērtību un vidējās vērtības standarta kļūdu jeb standartnovirzi. Tabulā jānorāda ķermeņa svars autopsijas brīdī, ķermeņa svara izmaiņas no devu došanas pirmās dienas līdz autopsijai, dzimumorgānu sistēmas akcesoro mērķaudu svars un pēc izvēles – citu orgānu svars.

Rezultātu apspriešana

Rezultātu analīze

59. Ķermeņa un orgānu svars autopsijas brīdī statistiski jāanalizē, lai noteiktu tādas īpašības kā dispersijas homogenitāte, vajadzības gadījumā norādot attiecīgas datu transformācijas. Vielas ievadīšanas grupas ir jāsalīdzina ar kontroles grupu, izmantojot tādas metodes kā *ANOVA*, un salīdzinot pārus (piemēram, Duneta vienpusējais tests), un statistisko atšķirību kritērijus, piemēram, $p \leq 0{,}05$. Jāidentificē grupas, kurās ir konstatēts statistiskais nozīmīgums. Tomēr "orgānu relatīvais svars" nav jānorāda, jo šā datu apkopošanas veida pamatā ir nepareizi statistiski pieņēmumi.

▼**M5**

60. Testējot androgēna agonismu, par kontroli jāizmanto testa grupa, kurai dod tikai nesējvielu. Testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida īpašības audos var izraisīt dažādas relatīvās atbildes reakcijas, piemēram, trenbolons, uz kuru neiedarbojas 5α reduktāze, vairāk ietekmē *LABC* un *GP*, nekā TP. Ja attiecībā uz diviem vai vairāk no pieciem testā izmantotajiem audu veidiem (VP, *LABC*, *GP*, *CG* un *SVCG*) vērojams statistiski nozīmīgs svara pieaugums ($p \leq 0,05$), uzskatāms, ka rezultāts attiecībā uz androgēna agonistu ir pozitīvs, turklāt zināms svara pieaugums ir jānovēro visos mērķaudos. Visu dzimumorgānu sistēmas akcesoro audu atbildes reakciju kopīgu izvērtējumu var sagatavot, izmantojot atbilstošu daudzveidīgu datu analīzi. Tas varētu uzlabot analīzes rezultātus, jo īpaši gadījumā, ja tikai vienam audu veidam ir novērota statistiski nozīmīga atbildes reakcija.

61. Testējot androgēna antagonismu, par kontroli jāizmanto androgēna standartvielas (tikai testosterona propionāts) testa grupa. Testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida īpašības audos var izraisīt dažādas relatīvās atbildes reakcijas, piemēram, salīdzinājumā ar spēcīgiem AR antagonistiem, piem., flutamīdu, 5α reduktāzes inhibitori (piem., finasterīds) vairāk ietekmē vēdera prostatu, nekā citus audus. Ja attiecībā uz diviem vai vairāk no pieciem testā izmantotajiem audu veidiem (VP, *LABC*, *GP*, *CG* un *SVCG*) vērojams statistiski nozīmīgs svara samazinājums ($p \leq 0,05$), kas korelē ar TP došanu, jau uzskatāms, ka rezultāts attiecībā uz androgēna antagonistu ir pozitīvs, turklāt zināms svara pieauguma samazinājums ir jānovēro visos mērķaudos. Visu dzimumorgānu sistēmas akcesoro audu atbildes reakciju kopīgu izvērtējumu var sagatavot, izmantojot atbilstošu daudzveidīgu datu analīzi. Tas varētu uzlabot analīzes rezultātus, jo īpaši gadījumā, ja tikai vienam audu veidam ir novērota statistiski nozīmīga atbildes reakcija.

62. Datus apkopo tabulā, norādot vidējo vērtību, vidējās vērtības standartkļūdu (vai standartnovirzi) un katras grupas parauga izlases lielumu. Jāiekļauj arī individuālo datu tabulas. Kontroldatu individuālās vērtības, vidējo vērtību, *SE* (*SD*) un variācijas koeficienta vērtību pārbauda, lai noteiktu, vai tie atbilst noteiktiem kritērijiem attiecībā uz atbilstību paredzamajām vēsturiskajām vērtībām. Ja variācijas koeficients pārsniedz 1. tabulā katra orgāna svaram sniegtās variācijas koeficienta vērtības (sk. 25. un 26. punktu), tas var liecināt par kļūdām datu dokumentēšanā vai pierakstīšanā vai laboratorijas neprecizitātēm androgēnatkarīgu audu secēšanā, un ir nepieciešama turpmāka apmācība/prakse. Parasti variācijas koeficienti (standartnovirze, ko dala ar orgānu vidējo svaru) dažādās laboratorijās un dažādos pētījumos ir reproducējami. Apkopojot datus, ir jāiekļauj vismaz dati par: vēdera prostatu, sēklas pūslīšiem, tūpļa cēlājmuskuliun briedumķermeņa muskuli, Kupera dziedzeriem, dzimumlocekļa galviņu, aknām, ķermeņa svaru un ķermeņa svara izmaiņām no devu došanas pirmās dienas līdz autopsijai. Datus var apkopot arī pēc tam, kad ķermeņa svars ir koriģēts attiecībā uz kovariāciju, bet ir jāiesniedz arī nekoriģētie dati. Turklāt, ja nevienā grupā nav konstatēta preputiālā atdalīšanās, tad preputiālās atdalīšanās biežumu dokumentē un statistiski salīdzina ar kontroles grupu (ar *Fisher Exact* testu).

▼**M5**

63. Verificējot datorā reģistrēto datu precizitāti salīdzinājumā ar oriģinālajām datu lapām, orgānu svara vērtības, kas nav bioloģiski ticamas vai kas par vairāk nekā trīs standartnovirzes vērtībām atšķiras no attiecīgās eksperimenta grupas vidējā radītāja, ir rūpīgi jāpārbauda un iespējams, ka tie dokumentēšanas kļūdas dēļ ir jāatmet.

64. Pētījuma rezultātu salīdzināšana ar ESAO variācijas koeficienta vērtībām (sk. 1. tabulu) parasti ir svarīgs solis pētījuma rezultātu derīguma interpretēšanā. Laboratorijā jāsaglabā agrāk iegūti dati par nesējvielas kontroles grupu. Laboratorijā ir jāsaglabā arī iepriekšēji dati par atbildes reakciju uz pozitīvu ķīmisko standartvielu, piemēram, TP un FT. Laboratorijā var regulāri testēt arī ietekmi uz zināmiem vājiem androgēnu agonistiem un antagonistiem un minētos datus saglabāt. Minētos datus var salīdzināt ar pieejamajiem ESAO datiem, lai nodrošinātu, ka laboratorijas metodes nodrošina pietiekamu statistisko precizitāti un nozīmību.

▼**M5**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Androgenitāte ir termins, ko izmanto, lai raksturotu pozitīvu ietekmi uz tādu audu augšanu, uz kuriem iedarbojas androgēns.

Antiandrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt TP darbību.

Ķīmiskā viela ir viela vai maisījums.

Dzimšanas diena ir 0. diena pēc piedzimšanas.

Deva ir ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daudzums. Heršbergera biotesta gadījumā devu izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas svaru uz vienu testa dzīvnieka ķermeņa svara vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa svara dienā).

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Mirstošs ir termins, ko izmanto, lai raksturotu dzīvnieku, kas mirst, t. i., tas ir tuvu nāvei.

X. diena pēc piedzimšanas ir X. dzīves diena pēc dzimšanas.

Jutība ir testēšanas metodes spēja pareizi identificēt ķīmiskās vielas, kurām ir raksturīga īpašība, kuras pārbaudei tiek veikts tests.

Specifiskums ir testēšanas metodes spēja pareizi identificēt ķīmiskās vielas, kurām nav raksturīga īpašība, kuras pārbaudei tiek veikts tests.

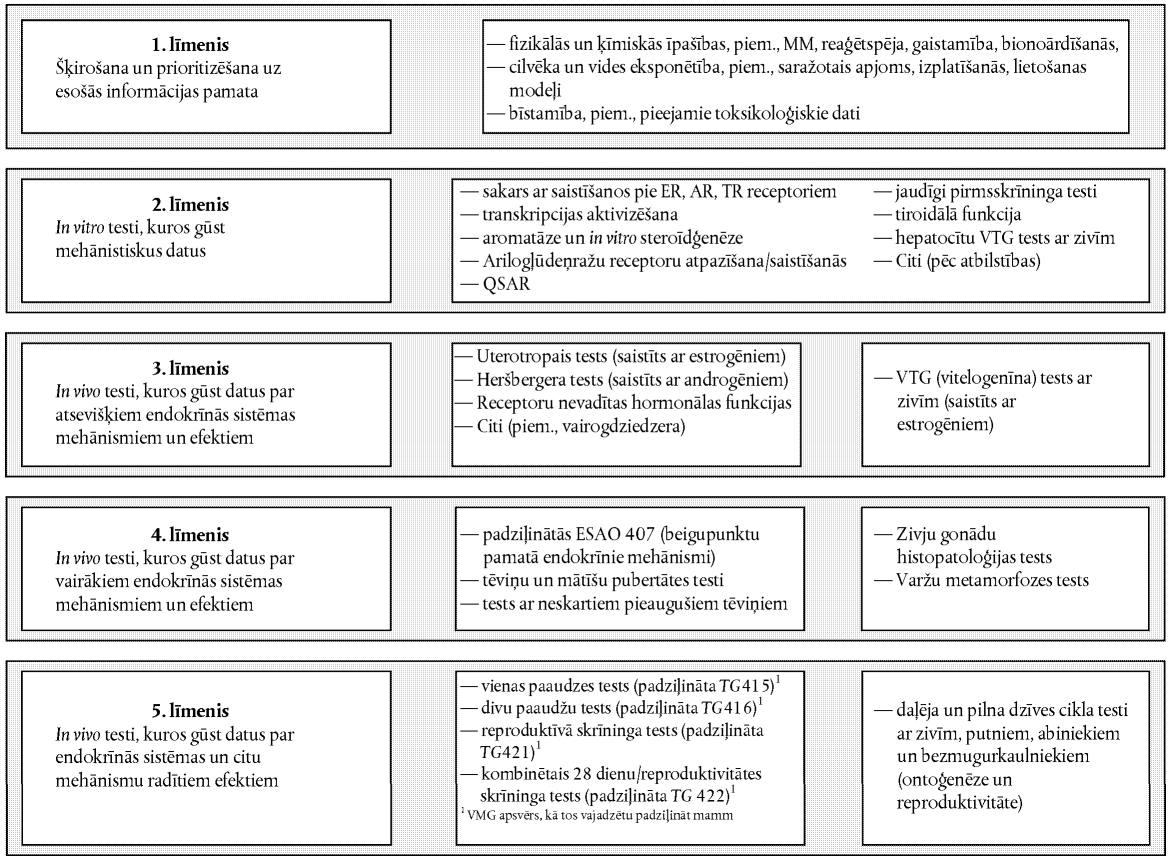
Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai maisījums, ko pārbauda, izmantojot šo testēšanas metodi.

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās uzticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

Piezīme: Dokumentu sagatavojis Testēšanas vadlīniju programs sekretariāts, pamatojoties uz EDTA darbības grupas 6. sanāksmē panākto vienošanos

ESAO konceptuālais pamatdokuments: endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošo ķīmisko vielu testēšana un novērtēšana



ZVPG: Zīdītāju testēšanas un novērtējuma validācijas pārvaldības grupa

▼**M5**

PIEZĪMES PAR REGULĒJUMU

1. piezīme. Pievienošanās un aiziešana ir iespējama visos līmeņos, un tā ir atkarīga tikai no tā, kāda esošā informācija ir vajadzīga bīstamības un riska noteikšanai.

2. piezīme. 5. līmenī ekotoksikoloģijā jāiekļauj beigupunkti, kas norāda uz negatīvās ietekmes mehānismiem, un iespējamo kaitējumu populācijai.

3. piezīme. Ja multimodāls modelis aptver vairākus testus, kas pastāv arī atsevišķi viena beigupunkta analīzei, minētos atsevišķa beigupunkta analīzes testus aizstāj ar šādu modeli.

4. piezīme. Katra ķīmiskā viela katrā gadījumā jānovērtē atsevišķi, ņemot vērā visu pieejamo informāciju un regulējuma līmeņu funkcijas.

5. piezīme. Šis regulējums pašlaik ir nepilnīgs. 3., 4. un 5. līmenī ir minētas analīzes, kas ir pieejamas vai kuras ir paredzēts apstiprināt tuvākajā laikā. Analīzes, kuras ir paredzēts apstiprināt, tiek iekļautas provizoriski. Tiklīdz tās būs pabeigtas un apstiprinātas, tās tiks oficiāli iekļautas šajā regulējumā.

6. piezīme. 5. līmenis neattiecas tikai uz galīgiem testiem. Minētajā līmenī iekļautie testi papildina vispārējo bīstamības un riska novērtējumu.

LITERATŪRA

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th 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 anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. Sk.: *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. In: 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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.

(27) Šā pielikuma nodaļas:

B.1.a. nodaļa "Akūts perorāls toksiskums – fiksētās devas metode"

B.1.b. nodaļa "Akūts perorāls toksiskums – akūta toksiskuma klases metode"

▼M5

B.56. **PAPLAŠINĀTAIS VIENAS PAAUDZES REPRODUKTĪVĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 443 (2012. gads). Tās pamatā ir Starptautiskā dabaszinātņu institūta (*ILSI*), Veselības un vides zinātnes institūta (*HESI*), Lauksaimniecības ķīmiskās drošības novērtēšanas (*ACSA*) tehniskās komitejas priekšlikums par F_1 dzīves cikla paplašināto vienas paaudzes reproduktīvās sistēmas pētījumu, kas publicēts *Cooper et al.*, 2006 (1). Ir veikti vairāki pētījuma plāna uzlabojumi un skaidrojumi, lai nodrošinātu elastīgumu un uzsvērtu nozīmi, kāda ir esošo zināšanu izmantošanai sākumposmā, vienlaicīgi papildinot tās ar novērojumiem dzīves laikā, lai vadītu un pielāgotu testēšanu. Šī testēšanas metode sniedz sīki izstrādātu aprakstu par paplašinātā vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījuma darbības vadību. Testēšanas metodē ir aprakstītas F_1 dzīvnieku trīs kohortas:

1. kohorta: tiek novērtēti reproduktīvie/attīstības beigupunkti; šo kohortu drīkst paplašināt, lai iekļautu F_2 paaudzi,

2. kohorta: tiek novērtēta ķīmisko vielu iedarbības iespējamā ietekme uz nervu sistēmu attīstības stadijā,

3. kohorta: tiek novērtēta ķīmisko vielu iedarbības iespējamā ietekme uz imūnsistēmu attīstības stadijā.

2. Lēmumi par to, vai novērtēt otro paaudzi un izlaist ontoģenēzes neirotoksicitātes kohortu un/vai ontoģenēzes imūntoksicitātes kohortu, jābalsta uz esošajām zināšanām par vērtējamo ķīmisko vielu, kā arī dažādu regulatīvo iestāžu vajadzībām. Testēšanas metodes mērķis ir sniegt informāciju par to, kā pētījumu var vadīt, un noteikt, kā ir jāizvērtē katra kohorta.

3. Procedūra, saskaņā ar kuru ierosina lēmumu par otro paaudzi, aprakstīta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 117 (39) tām regulatīvajām iestādēm, kuras šos lēmumus izmanto.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN MĒRĶI

4. Paplašinātā vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījuma galvenais mērķis ir izvērtēt konkrētus dzīves ciklus, kuri nav ietverti citu veidu toksicitātes pētījumos, un testēt ietekmi, kas var rasties, pakļaujot prenatālai un postnatālai ķīmiskās vielas iedarbībai. Attiecībā uz reproduktīviem beigupunktiem paredzēts, ka, pirmkārt un ja ir pieejama, tiek izmantota informācija, kas gūta atkārtotas devas pētījumos (tostarp reproduktīvās toksicitātes skrīninga pētījumos, piemēram, ESAO *TG* 422 (32)) vai endokrīnās sistēmas traucējumu īsā skrīninga testos (piemēram, uterotrofiskajā testā, B.54. testēšanas metode (36) un Heršbergera testā, B.55. testēšanas metode (37)), lai noteiktu ietekmi uz vīrišķajiem un sievišķajiem reproduktīvajiem orgāniem. Tā varētu aptvert spermatoģenēzi (sēklinieku histopatoloģija) tēviņiem un estrālos ciklus, folikulu skaitu/olšūnas nobriešanu un olnīcu integritāti (histopatoloģija) mātītēm. Paplašināto vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumu izmanto kā reproduktīvo beigupunktu testu, kura laikā jānotiek mijiedarbībai starp tēviņu un mātīti, mātīti un apaugļošanas produktu un mātīti un pēcnācējiem un F_1 paaudzi līdz dzimumbriedumam (sk. ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 151, kurā šī testēšanas metode pamatota (40)).

▼**M5**

5. Testēšanas metode ir izstrādāta, lai gūtu izvērtējumu par ķīmisko vielu ietekmi uz prenatālo un postnatālo attīstību, kā arī grūsnu un barojošu māšu un jaunu un pieaugušu pēcnācēju sistēmiskās toksicitātes pilnīgu novērtējumu. Gaidāms, ka sīki izmeklējumi par galvenajiem attīstības beigupunktiem, piemēram, pēcnācēju dzīvotspēju, jaundzimušo veselību, attīstības stāvokli atnešanās brīdī, fizisko un funkcionālo attīstību līdz pieaugušam vecumam, palīdzēs noteikt konkrētus pēcnācēju mērķorgānus. Turklāt pētījums sniegs un/vai apstiprinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz pieaugušas vīrišķās un sievišķās reproduktīvās sistēmas integritāti un darbību. Papildus citiem īpaši tiek aplūkoti šādi parametri: gonādu funkcija, estrālais cikls, spermas nobriešana sēklinieku piedēkļos, uzvedība pārošanās laikā, apaugļošanās, grūtniecība, atnešanās un laktācija. Turklāt informācija, kas iegūta no ontoģenēzes neirotoksicitātes un ontoģenēzes imūntoksicitātes novērtējumiem, raksturos iespējamo ietekmi uz minētajām sistēmām. Šajos testos iegūtie dati ir jāizmanto, lai noteiktu nenovērojamās nelabvēlīgas ietekmes līmeņus (*NOAEL*), zemākos novērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeņus (*LOAEL*) un/vai etalondevas attiecībā uz dažādiem beigupunktiem un/vai lai raksturotu iepriekšējos atkārtotas devas pētījumos konstatēto ietekmi, un/vai tie ir jāizmanto kā rokasgrāmata turpmākajā testēšanā.

6. 1. attēlā parādīts shematisks protokola attēlojums. Testējamā ķīmiskā viela pakāpeniskās devās tiek pastāvīgi ievadīta vairākām dzimumbriedumu sasniegušu tēviņu un mātīšu grupām. Šī vecākpaaudze (P) saņem devu noteiktā pirmspārošanas periodā (ko izvēlas, pamatojoties uz pieejamo informāciju par testējamo ķīmisko vielu, bet tas ir vismaz divas nedēļas) un divu nedēļu ilga pārošanas perioda laikā. P tēviņiem viela tiek turpmāk ievadīta vismaz līdz F_1 atšķiršanai. Tas jādara vismaz 10 nedēļas. Vielu var ievadīt arī ilgāk, ja ir jānoskaidro ietekme uz reproduktīvajām spējām. Vielas ievadīšana P mātītēm tiek turpināta grūtniecības un laktācijas periodā līdz likvidēšanai pēc atšķiršanas no metieniem (t. i., 8–10 devu došanas nedēļas). F_1 pēcnācējiem testējamo ķīmisko vielu joprojām ievada pēc atšķiršanas, līdz dzīvnieki ir pieauguši. Ja tiek novērtēta otrā paaudze (sk. ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 117 (39)), F_1 pēcnācējiem turpinās ievadīt vielu līdz F_2 atšķiršanai vai līdz pētījuma beigām.

7. Klīniskie novērojumi un patoloģiju izmeklējumi tiek veikti visiem dzīvniekiem attiecībā uz toksicitātes pazīmēm, īpašu uzsvaru liekot uz vīrišķās un sievišķās reproduktīvās sistēmas integritāti un darbību, kā arī pēcnācēju veselību, augšanu, attīstību un funkcijām. Atšķiršanas brīdī izraudzītie pēcnācēji tiek iedalīti noteiktās apakšgrupās (1.–3. kohorta, sk. 33. un 34. punktu un 1. attēlu), lai veiktu turpmāku izpēti, tostarp lai pētītu dzimumbriedumu, reproduktīvo orgānu integritāti un darbību, neiroloģiskos un uzvedības beigupunktus un imūnfunkcijas.

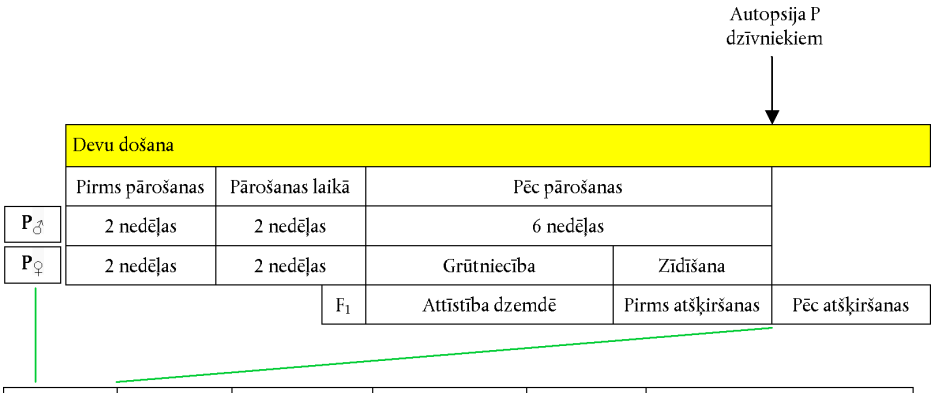
8. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (34).

▼M5

9. Kad būs pieejams pietiekams pētījumu daudzums, lai varētu pārliecināties par šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, testēšanas metode tiks pārskatīta, un vajadzības gadījumā to pārstrādās, ņemot vērā gūto pieredzi.

1. attēls

Paplašināta vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījuma shēma



Vecāku paaudze	Kohorta	Apzīmējums	Dzīvnieki no kohortas	Dzimumnoriešana	Aptuvenais vecums autopsijas brīdī: nedēļas
Mērķvērtība 20 metieni no grupas	1A	Reproduktīvā	20 T + 20 M	Jā	13
	1B	Reproduktīvā	20 T + 20 M	Jā	14 vai 20-25, ja process iesākts
	2A	neirotoksicitāte	10 T + 10 M @	Jā	11-12
	2B	neirotoksicitāte	10 T + 10 M @	Nē	3
	3	Imūntoksicitāte	10 T + 10 M @	Jā	8
	Pārpalikums	Rezerve		Nē	3

@ viens no metiena, ja iespējams, pārstāvot kopskaitā 20 metienus

METODES APRAKSTS/APRAKSTS PAR SAGATAVOŠANOS TESTAM

Dzīvnieki

Dzīvnieku sugas un līnijas izvēle

10. Sugas izvēle reproduktīvās toksicitātes testēšanai ir rūpīgi jāapsver, balstoties uz pieejamo informāciju. Tomēr, ņemot vērā pamatdatus un vispārīgās toksicitātes testu salīdzināmību, parasti priekšroka tiek dota žurkām, un šajā testēšanas metodē minētie kritēriji un ieteikumi attiecas uz šo sugu. Ja tiek izmantotas citas sugas, ir jāsniedz pamatojums un būs jāveic attiecīgi grozījumi protokolā. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai bieži sastopamiem spontāniem attīstības defektiem.

Vecums, ķermeņa svars un iekļaušanas kritēriji

11. Ir jāizmanto veseli vecākdzīvnieki, kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Ir jāpēta gan tēviņi, gan mātītes un jāizvēlas mātītes, kas nav dzemdējušas un nav grūsnas. P dzīvniekiem ir jābūt sasniegušiem dzimumbriedumu, ar vienādu svaru (dzimuma ietvaros) devu došanas sākumā, vienādā vecumā (aptuveni 90 dienas) pārošanas laikā un tiem jābūt reprezentatīviem pētāmajai sugai un līnijai. Pēc ierašanās dzīvniekiem vismaz 5 dienas ir jāaklimatizējas. Dzīvnieki tiek nejaušināti iedalīti kontroles un vielas ievadīšanas grupās tādā veidā, lai vidējās ķermeņa svara vērtības starp grupām būtu salīdzināmas (t. i., ± 20 % no vidējās vērtības).

▼M5

Turēšanas un barošanas nosacījumi

12. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °). Relatīvajam mitrumam jābūt 30–70 % robežās ar ideālo diapazonu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Ir jāpievērš uzmanība barības fitoestrogēna saturam, jo augsts fitoestrogēna līmenis barībā varētu ietekmēt dažus reproduktīvos beigupunktus. Tiek ieteikta standarta, parasta barība, kurā estrogēnu ķīmisko vielu līmenis ir samazināts (2) (30). Barības izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukumu, ievadot to saskaņā ar šo metodi. Ir jāverificē testējamās ķīmiskās vielas saturs, homogenitāte un stabilitāte barībā. Barība un dzeramais ūdens ir regulāri jāanalizē attiecībā uz piesārņojumu. Pētījumā izmantotās barības katras partijas paraugi ir jāglabā atbilstošos apstākļos (piemēram, sasaldēta –20 °C temperatūrā) līdz pārskata pabeigšanai gadījumā, ja rezultāti nosaka, ka jāanalizē barības sastāvdaļas.

13. Dzīvnieki ir jātur būros mazās viendzimuma grupās, kas pieder vienai un tai pašai vielas ievadīšanas grupai. Tos drīkst turēt atsevišķi, lai izvairītos no iespējamiem ievainojumiem (piemēram, tēviņus pēc pārošanas perioda). Pārošanas procedūras ir jāveic piemērotos būros. Pēc kopulācijas mātītes, kuras uzskata par grūsnām, tiek turētas atsevišķi atnešanās vai maternitātes būros, kuros tiek nodrošināts piemērots un noteikts migas veidošanas materiāls. Metieni līdz atšķiršanai tiek turēti ar mātēm. F_1 dzīvnieki ir jātur mazās grupās viena dzimuma un vielas ievadīšanas grupas ietvaros no atšķiršanas līdz izmēģinājuma beigām. Ja tam ir zinātnisks pamatojums, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Fitoestrogēnu līmenim izraudzītajā migas veidošanas materiālā ir jābūt minimālam.

Dzīvnieku skaits un identifikācija

14. Parasti katrā testa un kontroles grupā jābūt pietiekamam daudzumam pārošanai paredzētu pāru, lai iegūtu 20 grūsnas mātītes katrā devas grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu, lai varētu ticami izvērtēt ķīmiskās vielas ietekmes potenciālu attiecībā uz P paaudzes dzīvnieku auglību, grūsnību un mātišķo dzīvnieku uzvedību, kā arī uz F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz nobriešanai. Nespēja iegūt pietiekamu skaitu grūsnu dzīvnieku obligāti nepadara pētījumu par nederīgu, un tas ir jāvērtē katrā gadījumā atsevišķi, ņemot vērā iespējamo cēloņsakarību ar testējamo ķīmisko vielu.

15. Katram P dzīvniekam tiek piešķirts unikāls identifikācijas numurs, pirms tam sāk devu došanu. Ja laboratorijas vēsturiskajos datos norādīts, ka lielai daļai mātīšu nav regulāra (4 vai 5 dienas) estrālā cikla, pirms vielas ievadīšanas sākuma iesaka veikt estrālā cikla novērtējumu. Kā alternatīvu piedāvā grupas palielināšanu, lai nodrošinātu, ka vielas ievadīšanas sākumā vismaz 20 mātītēm katrā grupā ir regulārs (4 vai 5 dienas) estrālais cikls. Visiem F_1 pēcnācējiem piešķir unikālas identifikācijas zīmes brīdī, kad jaundzimušos pirmo reizi izmeklē 0. vai 1. dienā pēc piedzimšanas. Visā pētījuma periodā reģistrācija, kas norāda izcelsmes metienu, ir jāizdara par visiem atlasītajiem F_1 dzīvniekiem un vajadzības gadījumā F_2 dzīvniekiem.

▼M5

Testējamā ķīmiskā viela

Pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu

16. Liela nozīme ir esošās informācijas pārskatam, lai pieņemtu svarīgus lēmumus par ievadīšanas ceļu, nesējvielas izvēli, dzīvnieku sugu atlasi, devu atlasi un iespējamām izmaiņām devu došanas grafikā. Tāpēc, plānojot paplašināto vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumu, ir jāņem vērā visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu, t. i., fizikālķīmiskās īpašības, toksikokinētiskie dati (tostarp sugai raksturīgais metabolisms), toksikodinamiskās īpatnības, sakarība starp struktūru un aktivitāti (*SAR*), *in vitro* metoboliskie procesi, iepriekšējo toksicitātes pētījumu rezultāti un attiecīgā informācija par strukturālajiem analogiem. Sākotnējo informāciju par uzsūkšanos, izplatīšanos, metabolismu un izdalīšanos (*ADME*) un bioloģisko uzkrāšanos var iegūt no ķīmiskās struktūras, fizikālajiem un ķīmiskajiem datiem, spējas saistīt plazmas olbaltumvielu vai toksikokinētisko datu (TK) pētījumiem, vienlaicīgi toksicitātes pētījumu rezultāti dod papildu informāciju, piemēram, par *NOAEL*, metabolismu vai metabolisko aktivāciju.

Toksikokinētisko datu izskatīšana

17. Lai gan TK dati, kas iegūti iepriekš veiktu devu diapazona noteikšanas vai citu pētījumu rezultātā, nav obligāti jāizmanto, tie ir ārkārtīgi noderīgi, veidojot pētījuma plānu, izvēloties devas un interpretējot rezultātus. Īpaši lietderīgi ir dati, ar kuriem: 1) pārbauda testējamās ķīmiskās vielas (vai citu metabolītu) iedarbību uz augli un mazuli attīstības stadijā; 2) sniedz iekšēji uzņemto devu aplēsi un 3) novērtē kinētisko procesu no devas atkarīgo iespējamo piesātinājumu. Ja tie ir pieejami, jāizskata arī papildu TK dati, piemēram, metabolītu profili, koncentrācijas un laika līknes. Var savākt arī papildu TK datus pamatpētījuma laikā, ja tas netraucē vākt un interpretēt pamatpētījuma beigupunktus.

Vispārīgi, lai plānotu paplašināto vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumu, būru noderīgi šādi TK dati:

— vēla grūsnība (piemēram, 20. grūsnības diena) – mātītes asinis un augļa asinis,

— laktācijas vidusposms (10. diena pēc piedzimšanas) – mātītes asinis, mazuļa asinis un/vai piens,

— pēcatšķiršanas agrīnais posms (piemēram, 28. diena pēc piedzimšanas) – atšķirtā mazuļa asins paraugs.

Īpašu analītu (piemēram, sākotnējā ķīmiskā viela un/vai metabolīti) un paraugu ņemšanas shēma ir jānosaka, izmantojot elastīgu pieeju. Piemēram, attiecīgā paraugu ņemšanas dienā savācamo paraugu skaits un vākšanas laiks būs atkarīgs no iedarbības veida un iepriekšējām zināšanām par TK īpatnībām, kas novērotas mātītēm, kuras nav grūsnas. Attiecībā uz pētījumiem ar barību paraugu ņemšana vienā konkrētā laikā katru dienu ir pietiekama, bet mākslīgas barošanas gadījumā devu došanai var būt nepieciešami papildu paraugu ņemšanas laiki, lai iegūtu labāku aplēsi par iekšēji uzņemto devu diapazonu. Tomēr nevienā no paraugu ņemšanas dienām nav jāveido pilnīga koncentrācijas un laika līkne. Vajadzības gadījumā asinis var apkopot pa dzimumiem metienos, lai veiktu augļa un jaundzimušo analīzi.

▼**M5**

Ievadīšanas ceļš

18. Izvēloties ievadīšanas ceļu, jāņem vērā tas (tie) ceļš(-i), kas ir visvairāk saistīts(-i) ar cilvēka ekspozīciju. Lai gan protokols ir izstrādāts, lai testējamo ķīmisko vielu ievadītu ar barību, to var mainīt uz citu ievadīšanas ceļu (dzeramais ūdens, mākslīga barošana, ieelpošana, caur ādu) atkarībā no ķīmiskās vielas īpašībām un prasītās informācijas.

Nesējvielas izvēle

19. Vajadzības gadījumā testējamā ķīmiskā viela tiek izšķīdināta vai suspendēta piemērotā nesējvielā. Ja vien iespējams, ieteicams lietošanai izraudzīties šķīdumu/suspensiju uz ūdens bāzes, kā otro variantu izskatot šķīdumu/suspensiju uz eļļas bāzes (piemēram, kukurūzas eļļa). Attiecībā uz citām nesējvielām, kas nav ūdens, ir jāzina to toksiskās īpašības. Nevajag izvēlēties iespējami toksiskas nesējvielas (piemēram, acetons, *DMSO*). Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte nesējvielā. Ja nesējviela vai cita piedeva tiek izmantota, lai būtu vieglāk iedot devu, ir jāapsver šādas īpašības: ietekme uz uzsūkšanos, izplatīšanos, metabolismu vai testējamās ķīmiskās vielas aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; un ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu.

Devas izvēle

20. Parasti pētījumā jāietver vismaz trīs dažādi devu līmeņi un to vienlaicīga kontrole. Izvēloties piemērotus devas līmeņus, pētītājam jāņem vērā visa pieejamā informācija, tostarp informācija par devu došanu iepriekšējos pētījumos, TK dati par dzīvniekiem, kuri ir vai nav grūsni, laktācijas ceļā nodotais vielas daudzums un skaitliskais novērtējums par cilvēka ekspozīciju. Ja ir pieejami TK dati, kas liecina, ka TK procesos vērojams no devas atkarīgs piesātinājums, ir jācenšas izvairīties no lielām devām, kuras nepārprotami liecina par piesātinājumu, ja gaidāms, ka cilvēka ekspozīcija būs ievērojami zemāka par piesātinājuma punktu. Šādos gadījumos augstākās devas līmenis atrodas vai nu liekuma punktā pārejā uz TK īpašību nelinearitāti, vai nedaudz virs minētā punkta.

21. Ja nav attiecīgu TK datu, deva ir jāizvēlas, pamatojoties uz toksisko ietekmi, ja to neierobežo testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības. Ja devas līmeņus izraugās, balstoties uz toksicitāti, visaugstākā deva ir jāizvēlas, lai izraisītu nevis dzīvnieka nāvi vai smagas ciešanas, bet sistēmisku toksicitāti.

22. Devu līmeņi to samazinājuma virzienā jāizraugās, lai parādītu ar devu saistīto ietekmi, noteiktu *NOAEL* vai izraudzītos noteikšanas robežai tuvas devas, kas varētu palīdzēt noteikt etalondevu visjutīgākajam(-iem) beigupunktam(-iem). Lai izvairītos no lieliem devu intervāliem starp *NOAEL* un *LOAEL*, visbiežāk par optimālu uzskata divkāršu vai četrkāršu intervālu. Bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto devu grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

23. Ar kontroles grupas(-u) dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem, atšķiras tikai testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana. Šai grupai nav jābūt saņēmušai vielu vai jābūt placebo saņēmējai, vai nesējvielas kontroles grupai, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Ja tiek izmantota nesējviela, kontroles grupai jāsaņem lielākais izmantotais nesējvielas tilpums.

▼M5

Pieļaujamā daudzuma tests

24. Ja atkārtotas devas pētījumi nav liecinājuši par toksicitāti ar devas līmeni vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā vai ja, pamatojoties uz tādiem datiem par strukturāli un/vai metaboliski saistītām ķīmiskām vielām, kas liecina par līdzīgām *in vivo*/*in vitro* metaboliskām īpatnībām, toksicitāte nebūtu gaidāma, iespējams, nav vajadzīgs pētījums ar vairākiem devu līmeņiem. Šādos gadījumos paplašināto vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumu varētu veikt, izmantojot kontroles grupu un vienu devu vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā. Tomēr, ja ar šādu robeždevu tiek konstatētas reproduktīvās vai ontoģenēzes toksicitātes liecības, jāveic turpmāki pētījumi ar mazākām devām, lai konstatētu *NOAEL*. Šos apsvērumus par pieļaujamā daudzuma testu izmanto tikai tad, ja cilvēka ekspozīcija neliecina, ka deva jāpalielina.

PROCEDŪRAS

Iedarbība uz pēcnācējiem

25. Vēlamais paņēmiens ir ievadīšana uz barību. Attiecībā uz mākslīgas barošanas pētījumiem ir jāņem vērā, ka parasti līdz atšķiršanas brīdim, kad mazuļiem sāks dot devu tieši, tie saņems testējamo ķīmisko vielu tikai netieši, ar pienu. Barības vai dzeramā ūdens pētījumos mazuļi papildus saņems testējamo ķīmisko vielu tieši, kad tie laktācijas perioda pēdējā nedēļā sāks ēst paši. Ja testējamās ķīmiskās vielas izdalīšanās pienā ir neliela un ja trūkst pierādījumu par nepārtrauktu mazuļu eksponēšanu, jāapsver, vai pētījuma plānā neizdarīt izmaiņas. Šajos gadījumos, pamatojoties uz pieejamo TK informāciju, pēcnācēju toksicitāti vai biomarķieru izmaiņām, ir jāapsver tieša devas došana mazuļiem laktācijas periodā (3)(4). Pirms uzsākt pētījumus ar tiešu devu došanu zīdāmiem mazuļiem, ir rūpīgi jāapsver to priekšrocības un trūkumi (5).

Devu došanas grafiks un devu ievadīšana

26. Iespējams, ka ir pieejama informācija par estrāliem cikliem, vīrišķās un sievišķās reproduktīvās sistēmas histopatoloģiju un sēklinieku/sēklinieku piedēkļu spermas analīzi, kas iegūta iepriekšējo pietiekami ilgu atkārtotas devas toksicitātes pētījumu laikā. Paplašinātā vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumā vielas ievadīšanas ilgumam pirms pārošanas jābūt tādam, lai varētu noteikt ietekmi uz funkcionālām izmaiņām, kuras var kavēt pārošanās uzvedību un apaugļošanos. Vielas ievadīšanai pirms pārošanas jābūt pietiekami ilgai, lai sasniegtu ilgstošas ekspozīcijas apstākļus P tēviņiem un mātītēm. Vairumā gadījumu par pietiekamu uzskata divu nedēļu ilgu vielas ievadīšanu abiem dzimumiem pirms pārošanas. Attiecībā uz mātītēm tas ietver 3–4 pilnus estrālos ciklus, un ar to jāpietiek, lai noteiktu jebkādu nelabvēlīgu ietekmi uz cikliskumu. Attiecībā uz tēviņiem tas līdzinās laikam, kas vajadzīgs, lai nobrieduši spermotozoīdi izietu no sēklinieku piedēkļiem, un šajā laikā jāvar konstatēt sēkliniekos radušos ietekmi uz spermu (spermas veidošanās un spermas nobriešanas spermas piedēkļos pēdējos posmos) pārošanas laikā. Pētījuma beigās, kad ir paredzēta sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija un spermas parametru analīze, P un F_1 tēviņi būs eksponēti vismaz vienu pilnu spermatoģenēzes ciklu (6) (7) (8) (9), sk. ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 151 (40).

▼M5

27. Pirmspārošanas ekspozīcijas scenārijus tēviņiem var koriģēt, ja sēklinieku toksicitāte (spermatoģenēzes pasliktināšanās) vai ietekme uz spermas integritāti un darbību ir skaidri konstatēta iepriekšējos pētījumos. Līdzīgi dažādus pirmspārošanas ekspozīcijas scenārijus var pamatot attiecībā uz mātītēm, kur zināma testējamās ķīmiskās vielas ietekme uz estrālo ciklu un tādējādi uz to seksuālo atbildes reakciju. Īpašos gadījumos ir pieņemams, ka vielas ievadīšanu P mātītēm uzsākt tikai pēc tam, kad saņemta uztriepe ar pozitīvu reakciju uz spermu (sk. ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 151 (40)).

28. Kad ir noteikts pirmspārošanas devu došanas periods, dzīvniekiem testējamā ķīmiskā viela jāsaņem nepārtraukti 7 dienas nedēļā līdz autopsijai. Visiem dzīvniekiem devas jādod ar vienu un to pašu paņēmienu. Devu došana jāturpina 2 nedēļu ilgā pārošanas perioda laikā un attiecībā uz P mātītēm visā grūsnības un laktācijas periodā līdz to likvidēšanai pēc atšķiršanas. Tēviņiem viela jādod tādā pašā veidā līdz to likvidēšanai laikā, kad F_1 dzīvnieki tiek atšķirti. Autopsiju pirmajām veic mātītēm, kurām autopsija ir jāveic vienā un tajā pašā laktācijas dienā vai tuvu tai. Tēviņu autopsiju var veikt vairākas dienas atkarībā no laboratorijas iespējām. Ja vien tieša devas došana nav sākta jau laktācijas periodā, izraudzītajiem F_1 tēviņiem un mātītēm tā jāsāk atšķiršanas brīdī un atkarībā no iedalījuma kohortā jāturpina līdz paredzētajai autopsijai,.

29. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām, kas ievadītas ar barību vai dzeramo ūdeni, ir svarīgi pārliecināties, ka testējamās ķīmiskās vielas daudzums netraucē normālu barības uzņemšanu vai un ūdens līdzsvaru. Ja testējamā ķīmiskā viela tiek ievadīta ar barību, var izmantot vai nu nemainīgu tās koncentrāciju barībā (milj. daļas), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru; izvēlētais risinājums ir jānorāda.

30. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu, ievadītā šķidruma tilpums vienā reizē nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (maksimālais eļļas daudzums, piemēram, kukurūzas eļļas gadījumā, ir 0,4 ml uz 100 g ķermeņa svara). Izņemot kairinošas vai kodīgas ķīmiskas vielas, kam augstākā koncentrācijā parasti ir saasināta iedarbība, testa tilpuma izmaiņas ir jāsamazina līdz minimumam, pielāgojot koncentrāciju, lai nodrošinātu nemainīgu tilpumu visos devu līmeņos. Viela katru dienu jāievada vienā un tajā pašā laikā. Parasti deva katram dzīvniekam ir jānosaka, pamatojoties uz pēdējo individuāli noteikto ķermeņa svaru, un jākoriģē vismaz reizi nedēļā pieaugušiem tēviņiem un pieaugušām mātītēm, kas nav grūsnas, un reizi divās dienās grūsnām mātītēm un F_1 dzīvniekiem, kam devu ievada pirms atšķiršanas un divu nedēļu laikā pēc atšķiršanas. Ja TK datos norādīts, ka testējamā ķīmiskā viela slikti izkļūst cauri placentai, mākslīgās barošanas devu pēdējā grūtniecības nedēļā drīkst koriģēt tā, lai novērstu pārmērīgi toksiskas devas ievadīšanu mātītei. Atnešanās dienā mātītēm viela nav jāievada ne ar mākslīgo barošanu, ne jebkādā citā ceļā, kas saistīts ar dzīvnieka aiztikšanu; šajā dienā ieteicams drīzāk neievadīt testējamo ķīmisko vielu, nevis traucēt atnešanos.

▼M5

Pārošana

31. Katra P mātīte jānovieto kopā ar vienu nejaušināti izraudzītu neradniecisku tēviņu no tās pašas devas grupas (1:1 pārošana), līdz tiek konstatēts kopulācijas fakts vai pagājušas divas nedēļas. Ja tēviņu nepietiek, piemēram, pirms pārošanas tie gājuši bojā, drīkst pārot (1:1) jau pārotu(-us) tēviņu(-us) ar otru mātīti, tādējādi sapārojot visas mātītes. Grūtniecību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies pārošanas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Dzīvnieki ir jānošķir iespējami ātri pēc kopulācijas fakta konstatēšanas. Ja pēc divām nedēļām pārošanās nav notikusi, dzīvnieki ir jānošķir, un turpmāk tos pārot nedrīkst. Datos skaidri jānorāda sapārotie pāri.

Metiena lielums

32. Ceturtajā dienā pēc atnešanās mazuļu skaitu katrā metienā var samazināt, ja iespējams, tajā nejaušināti atstājot piecus vīrišķos un piecus sievišķos mazuļus. Mazuļu skaita samazināšana izlases veidā, piemēram, pamatojoties uz ķermeņa svaru, nav jāveic. Ja metiena vīrišķo un sievišķo mazuļu skaita dēļ nav iespējams atstāt piecus katra dzimuma pārstāvjus, ir pieņemama daļēja koriģēšana (piemēram, seši vīrišķie un četri sievišķie mazuļi).

Mazuļu izlasīšana pēcatšķiršanas pētījumiem (sk. 1. attēlu)

33. Atšķiršanas brīdī (aptuveni 21. dienā pēc piedzimšanas) no visiem pieejamajiem metieniem katrā devas un kontroles grupā tiek izlasīti ne vairāk kā 20 mazuļi, kuriem veic turpmākus izmeklējumus līdz dzimumbrieduma sasniegšanai (ja vien testēšana nav jāveic agrāk). Mazuļus izlasa nejaušināti, neiekļaujot nīkuļus (dzīvniekus, kuru ķermeņa svars ir par vairāk nekā divām standartnovirzēm mazāks nekā vidējais attiecīgā metiena mazuļu svars), jo vielas ievadīšanas grupai tie nav pietiekami reprezentatīvi.

Atlasītos F_1 mazuļus 21. dienā pēc piedzimšanas pēc nejaušas izvēles principa iedala vienā no trīs dzīvnieku kohortām:

1. kohorta (1A un 1B) = reproduktīvās/ontoģenēzes toksicitātes testēšana,

2. kohorta (2A un 2B) = ontoģenēzes neirotoksicitātes testēšana,

3. kohorta = ontoģenēzes imūntoksicitātes testēšana.

1A kohorta: viens tēviņš un viena mātīte/metiens/grupa (20/dzimums/-grupa): prioritāra izlase primāram ietekmes uz reproduktīvo sistēmu un vispārējas toksicitātes novērtējumam.

1B kohorta: viens tēviņš un viena mātīte/metiens/grupa (20/dzimums/-grupa): prioritāra izlase reproduktīvās sistēmas darbības turpmākam novērtējumam, pārojot un novērtējot F_1 dzīvniekus (sk. ESAO Testēšanas norādījumus 117 (39)), un papildu histopatoloģijas datu ieguvei gadījumos, kad ir aizdomas par reproduktīvai vai endokrīnai sistēmai toksiskām vielām vai ja 1A kohortas rezultāti ir pārprotami.

2A kohorta: kopā 20 mazuļi katrā grupā (10 tēviņi un 10 mātītes katrā grupā; 1 tēviņš vai 1 mātīte no katra metiena) tiek iedalīti, lai testētu iedarbību uz centrālo nervu sistēmu, pēc tam veicot pieaugušu dzīvnieku neirohistopatoloģijas novērtējumu.

2B kohorta: kopā 20 mazuļi katrā grupā (10 tēviņi un 10 mātītes katrā grupā; 1 tēviņš vai 1 mātīte no katra metiena) tiek iedalīti, lai veiktu neirohistopatoloģijas novērtējumu atšķiršanas brīdī (21. vai 22. diena pēc piedzimšanas). Ja dzīvnieku skaits nav pietiekams, priekšroka ir jādod dzīvnieku iedalīšanai 2A kohortā.

▼M5

3. kohorta: kopā 20 mazuļi katrā grupā (10 tēviņi un 10 mātītes katrā grupā; iespēju robežās viens no katra metiena). Iespējams, ka kontroles grupas mazuļus būs nepieciešams izmantot par pozitīvās kontroles dzīvniekiem no T šūnas atkarīgas antivielas reakcijas testā (*TDAR*) 56. dienā pēc piedzimšanas (± 3 dienas).

34. Ja metienā nav pietiekami daudz mazuļu, lai tos iedalītu visās kohortās, priekšroka tiek dota 1. kohortai, jo to var paplašināt, lai veidotu F_2 paaudzi. Papildu mazuļus drīkst iedalīt jebkurā kohortā tādā gadījumā, ja pastāv konkrētas bažas, piemēram, aizdomas, ka ķīmiskā viela ir neirotoksiska, imūntoksiska vai reproduktīvai sistēmai toksiska viela. Šos mazuļus drīkst izmantot izmeklējumos dažādos laika punktos vai izvērtēšanai papildu beigupunktos. Mazuļi, kas nav iedalīti kohortās, tiks nodoti klīniskai bioķīmijai (55. punkts) un autopsijai (68. punkts).

P dzīvnieku otrā pārošana

35. Parasti neiesaka veikt P dzīvnieku otro pārošanu, jo tādējādi tiek zaudēta vērtīga informācija par implantācijas vietu skaitu (un arī pēcimplantācijas un perinatālo zaudējumu dati, iespējamas teratogenitātes rādītāji) par pirmo metienu. Paplašinot pētījumu un ietverot tajā F_1 paaudzes pārošanu, tiktu labāk apmierināta vajadzība pārbaudīt vai izskaidrot ietekmi uz devas saņēmējām mātītēm. Tomēr vienmēr ir iespējams veikt P tēviņu otro pārošanu ar mātītēm, kurām nav dota viela, lai noskaidrotu pārprotamos konstatējumus vai papildinātu pirmās pārošanas laikā izstrādāto raksturojumu par ietekmi uz auglību.

NOVĒROJUMI DZĪVES LAIKĀ

Klīniskie novērojumi

36. Attiecībā uz P un atlasītiem F_1 dzīvniekiem vispārīgus klīniskus novērojumus veic reizi dienā. Ja devas dod ar mākslīgo barošanu, klīniskie novērojumi jāveic pirms un pēc devas došanas (lai novērotu iespējamās ar maksimālo koncentrāciju plazmā saistītās toksicitātes pazīmes). Tiek reģistrētas attiecīgas uzvedības izmaiņas, smagas vai ieilgušas atnešanās pazīmes un visas toksicitātes pazīmes. Divas reizes dienā, nedēļas nogalē vienu reizi dienā visi dzīvnieki tiek izmeklēti, lai konstatētu smagu toksicitāti, saslimstību un mirstību.

37. Turklāt reizi nedēļā tiek veikti sīkāki P un F_1 dzīvnieku izmeklējumi (pēc atšķiršanas), un to var ērti izdarīt, kad dzīvnieks tiek svērts, tādējādi mazinot iejaukšanās radīto stresu. Novērojumi ir rūpīgi jāveic un jāreģistrē, izmantojot punktu sistēmu, kuru ir noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt minimālas testēšanas apstākļu pārmaiņas. Norādītajām pazīmēm jāietver (bet ne tikai) izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, kā arī sekrēcija un izdalījumi un veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametrs, neraksturīga elpošana). Ir jāreģistrē izmaiņas gaitā, stājā, reakcijā uz aprūpi, kā arī klonisko vai tonisko kustību esamība, izmaiņas stereotipos (piemēram, pārmērīga kopšanās, atkārtota griešanās) vai dīvaina izturēšanās (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atpakaļvirzienā).

▼M5

Ķermeņa svars un barības/ūdens patēriņš

38. P dzīvnieki tiek svērti devas došanas pirmajā dienā un pēc tam vismaz reizi nedēļā. Turklāt P mātītes laktācijas periodā tiek svērtas tajās pašās dienās, kad tiek svērti metiena mazuļi (sk. 44. punktu). Visi F_1 dzīvnieki tiek svērti individuāli atšķiršanas brīdī (21. dienā pēc piedzimšanas) un pēc tam vismaz reizi nedēļā. Ķermeņa svars tiek reģistrēts arī pubertitātes sasniegšanas dienā (kad notiek preputiālā atdalīšanās vai vagīnas atvēršanās). Visi dzīvnieki tiek svērti pēc nonāvēšanas.

39. Pētījuma laikā barības un ūdens patēriņš (gadījumā, ja testējamās ķīmiskās vielas deva tiek dota ar dzeramo ūdeni) tiek reģistrēts vismaz reizi nedēļā tajā pašā dienā, kad reģistrē dzīvnieka ķermeņa svaru (izņemot kopā turēšanas laiku). Katra F_1 dzīvnieku būra barības patēriņš tiek uzskaitīts reizi nedēļā, sākot no attiecīgās kohortas atlases brīža.

Estrālie cikli

40. Iespējams, ka ir pieejama sākotnējā informācija par testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz estrālo ciklu, kas iegūta iepriekšējo atkārtotas devas toksicitātes pētījumu laikā, un to var izmantot, izstrādājot ar testējamo ķīmisko vielu saistīto protokolu paplašinātam vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījumam. Parasti estrālā cikliskuma novērtēšana (izmantojot vaginālo citaloģiju) sāksies vielas ievadīšanas perioda sākumā un turpināsies līdz pārošanas fakta apstiprinājumam vai divu nedēļu ilgā pārošanas perioda beigām. Ja mātītēm skrīningā ir konstatēts normāls estrālais cikls pirms vielas ievadīšanas, sākot vielas ievadīšanu, būtu jāturpina ņemt uztriepes, bet, ja rodas bažas par neraksturīgu ietekmi vielas ievadīšanas sākumā (piemēram, izteikts barības patēriņa samazinājums), dzīvniekiem drīkst atļaut pielāgoties vielas saņemšanai līdz pat divām nedēļām, pirms sākt divu nedēļu uztriepju ņemšanas periodu pirms pārošanas. Ja mātītei vielas saņemšanas periods tiek pagarināts minētajā veidā (t. i., līdz četrām nedēļām pirms pārošanas apstrādes), ir jāapsver jaunāku dzīvnieku iegāde un vielas saņemšanas perioda pagarināšana tēviņiem pirms pārošanas. Iegūstot vagīnas/dzemdes kakla šūnas, jācenšas izvairīties no gļotādas bojāšanas un sekojošas pseidogrūsnības ierosināšanas (10) (11).

41. A1 kohortas F_1 mātīšu vaginālās uztriepes ir jāizmeklē katru dienu pēc vagīnas atvēršanās, līdz tiek reģistrēta pirmā uztriepe ar apsēklošanas pazīmēm, lai noteiktu laikposmu starp šiem diviem notikumiem. Visām A1 kohortas F_1 mātītēm estrālais cikls ir jāuzrauga divas nedēļas, sākot no aptuveni 75. dienas pēc piedzimšanas. Turklāt, ja rodas vajadzība pārot F_1 paaudzi, 1B kohortas vaginālajai citoloģijai sekos no pārošanas brīža, līdz tiks saņemts kopulācijas fakta apstiprinājums.

Pārošana un grūtniecība

42. Papildus standarta beigupunktiem (piemēram, ķermeņa svars, barības patēriņš, klīniskie novērojumi, tostarp saslimstības/mirstības pārbaudes) tiek reģistrēti pārošanas datumi, apaugļošanas datumi un atnešanās datumi, kā arī tiek aprēķināti postkoitālie intervāli (no pārošanas līdz apaugļošanai) un grūtniecības ilgums (no apaugļošanas līdz atnešanās brīdim). P mātītes ir rūpīgi jāizmeklē gaidāmās atnešanās laikā, lai konstatētu distocijas pazīmes. Ir jāreģistrē jebkuras novirzes, kas vērojamas migas veidošanas vai zīdīšanas laikā.

▼M5

43. Laktāciju (0. laktācijas diena) sāk skaitīt no atnešanās dienas attiecībā uz māti un 0. dienu pēc piedzimšanas attiecībā uz mazuli. Kā alternatīvu visus salīdzinājumus piedāvā balstīt uz postkoitālo laiku, lai izslēgtu kļūdas postnatālās attīstības datos dažādu grūtniecības periodu ilguma dēļ; tomēr ir jāreģistrē arī atnešanās laiks. Tas ir ļoti svarīgi, ja testējamā ķīmiskā viela ietekmē grūtniecības ilgumu.

Pēcnācēju parametri

44. Katrs metiens ir jāizmeklē iespējami drīz pēc atnešanās (0. vai 1. dienā pēc piedzimšanas), lai noteiktu mazuļu skaitu un dzimumu, nedzīvi piedzimušos, dzīvi piedzimušos un makroskopisku anomāliju esamību (redzamas ārējas novirzes, tostarp vilka rīkle, zemādas hemorāģija, ādas krāsas vai tekstūras novirzes, nabassaite, piena trūkums vēderā, izžuvusi sekrēcija). Turklāt pirmo klīnisko izmeklējumu laikā jāveic kvalitatīvs jaundzimušo novērtējums – ķermeņa temperatūra, aktivitātes līmenis un reakcija uz aprūpi. Mazuļi, kas atrasti miruši 0. dienā pēc piedzimšanas vai vēlāk ir jāizmeklē, lai noteiktu iespējamo kaitējumu un nāves iemeslu. Dzīvos mazuļus individuāli saskaita un nosver 0. vai 1. dienā pēc piedzimšanas un pēc tam regulāri, piemēram, vismaz 4., 7., 14. un 21. dienā pēc piedzimšanas. Klīniskie izmeklējumi, ko veic attiecīgā dzīvnieku vecumā, ir jāatkārto, pēcnācējus sverot, vai biežāk, ja atnešanās brīdī ir konstatēti īpaši gadījumi. Norādītās pazīmes varētu būt ārējās novirzes, izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrēcijas un izdalījumu parādīšanās un veģetatīvā aktivitāte, kā arī citas pazīmes. Ir jāreģistrē izmaiņas gaitā, stājā, reakcijā uz aprūpi, kā arī klonisko vai tonisko kustību esamība, izmaiņas stereotipos vai neraksturīga izturēšanās.

45. Ir vismaz vienu reizi jānomēra katra mazuļa anogenitālais attālums (*AGD*) laikposmā no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (12). Krūtsgali/areolas vīrišķiem mazuļiem ir jāpārbauda 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas.

46. Visiem atlasītajiem F_1 dzīvniekiem katru dienu tiek novērtēta vagīnas atvēršanās vai balanopreputiālā atdalīšanās attiecīgi mātītēm/tēviņiem, lai konstatētu, vai šie beigupunkti tiek sasniegti pirms plānotās dienas un dzimumbriedums tiek sasniegts agrāk. Būtu jānorāda jebkuras dzimumorgānu novirzes, piemēram, pastāvīgi izdalījumi no vagīnas, hipospādija vai iekaisis penis. F_1 dzīvnieku dzimumbriedums tiek salīdzināta ar fizisko attīstību, nosakot vecumu un ķermeņa svaru laikā, kad notiek vagīnas atvēršanās vai balanopreputiālā atdalīšanās attiecīgi mātītēm/tēviņiem.

Potenciālās ontoģenēzes neirotoksicitātes novērtējums (2A un 2B kohorta)

47. Neirotoksicitātes novērtēšanā būtu jāizmanto 10 vīrišķie un 10 sievišķie 2A kohortas dzīvnieki un 10 vīrišķie un 10 sievišķie 2B kohortas dzīvnieki no katras vielas ievadīšanas grupas (katrai kohortai: 1 tēviņš vai 1 mātīte no katra metiena; visus metienus pārstāv vismaz 1 mazulis; nejaušināta izlase). 2A kohortas dzīvniekiem ir jāveic reakcijas uz dzirdes kairinātājiem, funkcionālo novērojumu sērijas, motoriskās aktivitātes (sk. 48.–50. punktu) un neiropatoloģijas novērtēšana (sk. 74.–75. punktu). Ir jācenšas

▼M5

nodrošināt, ka testēšanas apstākļu pārmaiņas ir minimālas un nav sistemātiski saistītas ar vielas ievadīšanu. Starp mainīgajiem rādītājiem, kas var ietekmēt uzvedību, ir skaņas līmenis (piemēram, saraustīts troksnis), temperatūra, mitrums, apgaismojums, smaržas, dienas laiks un vides kairinātāji. Neirotoksicitātes testu rezultāti ir jāinterpretē atbilstīgi vēsturiskiem kontroles atsauces diapazoniem. 2B kohortas dzīvnieki ir jāizmanto neiropatoloģijas novērtējumam 21. vai 22. dienā pēc piedzimšanas (sk. 74.–75. punktu).

48. Tests ar dzirdes kairinātājiem ir jāveic 24. dienā pēc piedzimšanas (± 1 diena), izmantojot 2A kohortas dzīvniekus. Testēšanas diena ir savstarpēji jāsaskaņo starp vielas ievadīšanas un kontroles grupām. Katra sesija ietver 50 mēģinājumus. Veicot testu ar dzirdes kairinātājiem, vidējā reakcijas amplitūda uz katru 10 mēģinājumu kopumu (5 kopumi pa 10 mēģinājumiem) ir jānosaka, optimizējot testa nosacījumus tādā veidā, lai radītu pieraduma veidošanos sesijas laikā. Šīm procedūrām ir jāatbilst B.53. testēšanas metodei (35).

49. Piemērotā laikā starp 63. un 75. dienu pēc piedzimšanas 2A kohortas dzīvnieki tiek novirzīti uz funkcionālo novērojumu sēriju un automātisku motoriskās aktivitātes testu. Šīm procedūrām ir jāatbilst B.43. testēšanas metodei (33) un B.53. testēšanas metodei (35). Funkcionālo novērojumu sērija ietver dzīvnieka ārienes, uzvedības un funkcionālās integritātes pilnu aprakstu. To novērtē, veicot novērojumus dzīvnieka turēšanas būrī, pēc pārvietošanas uz novērojumu standartnožogojumu (atklāta telpa), kur dzīvnieks brīvi kustas, un manipulatīvus testus. Testēšanai jānotiek no mazas savstarpējas mijiedarbības uz pieaugošu. Pasākumu saraksts ir ietverts 1. pielikumā. Visi dzīvnieki rūpīgi jānovēro apmācītiem novērotājiem, kuri nav informēti par dzīvnieku apstrādes statusu, un jāizmanto standartprocedūras, lai samazinātu novērotāju mainību. Iespēju robežās ieteicams, ka dzīvniekus attiecīgā testā novērtē viens un tas pats novērotājs. Ja tas nav iespējams, ir jāsniedz pierādījumi par novērotāju uzticamību. Attiecībā uz katru parametru uzvedības testēšanas sērijā ir jāizmanto skaidri operatīvi noteikti mērogi un punktu piešķiršanas kritēriji. Iespēju robežās jāizstrādā objektīvi kvantitatīvie pasākumi novērojumu beigupunktiem, kuri ietver subjektīvu vērtēšanu. Attiecībā uz kustību aktivitāti katru dzīvnieku testē individuāli. Testa sesijai jābūt pietiekami ilgai, lai kontroldzīvniekiem sesijas laikā veidotos pieradums. Kustību aktivitāte ir jāuzrauga, izmantojot automātisku aktivitātes reģistrēšanas iekārtu, ar kuru jānosaka gan aktivitātes pieaugums, gan samazinājums (t. i., ierīces noteiktā pamataktivitāte nedrīkst būt tik zema, lai padarītu neiespējamu samazinājuma noteikšanu, un tik augsta, lai padarītu neiespējamu aktivitātes pieauguma noteikšanu). Katra ierīce ir jātestē, izmantojot standarta procedūras, lai iespēju robežās nodrošinātu, ka visā darbības laikā ierīču kopums darbojas uzticami. Iespēju robežās vielas ievadīšanas grupas attiecībā uz ierīcēm jāsadala vienmērīgi. Vielas ievadīšanas grupās jānodrošina arī testēšanas laiku līdzsvars, lai nelabvēlīgu ietekmi neradītu aktivitātes diennakts ritmi.

50. Ja esošā informācija liecina par vajadzību veikt citus (piemēram, sensorās, sociālās, kognitīvās) darbības testus, šie testi ir jāiekļauj, netraucējot citu pētījuma ietvaros veikto novērtējumu integritāti. Ja šo testēšanu veic ar tiem pašiem dzīvniekiem, kurus izmanto standarta testam ar dzirdes kairinātājiem, funkcionālo novērojumu sērijai un motoriskās aktivitātes testēšanai, ir jāparedz dažādi testi, lai samazinātu šo testu integritātes apdraudējumu. Īpaši noderīgas var būt papildu procedūras, ja empīriskie novērojumi, gaidāmā ietekme vai mehāniskais/iedarbības veids liecina par īpaša veida neirotoksicitāti.

▼M5

Iespējamās ontoģenēzes imūntoksicitātes novērtējums (3. kohorta)

51. 56. dienā pēc piedzimšanas (± 3 dienas) no T šūnas atkarīgas antivielas reakcijas testā, t. i., sākotnējā IgM antivielu reakcija uz antigēnu, kas atkarīgs no T šūnas, piemēram, *Sheep Red Blood Cells* (*SRBC*) vai *Keyhole Limpet Hemocyanin* (*KLH*), ir jāizmanto 10 vīrišķie un 10 sievišķie 3. kohortas dzīvnieki no katras vielas ievadīšanas grupas (1 tēviņš un 1 mātīte no katra metiena; visus metienus pārstāv vismaz 1 mazulis; atlase izdarīta pēc nejaušas izlases principa) atbilstīgi pašreizējām imūntoksicitātes testēšanas procedūrām (14) (15). Reakciju var novērtēt, saskaitot īpašus plakus veidojošās šūnas (*PFC*) liesā vai nosakot *SRBC* vai *KLH* raksturīgu IgM antivielas titru serumā, izmantojot *ELISA*, reakcijas maksimālajā punktā. Parasti reakcijas maksimālais punkts tiek sasniegts četras (*PFC* reakcija) vai piecas (*ELISA*) dienas pēc intravenozas imunizēšanas. Ja primārā antivielas reakcija tiek testēta, skaitot plakus veidojošās šūnas, dzīvnieku apakšgrupas ir atļauts novērtēt atsevišķās dienās, ja: apakšgrupas imunizēšanas un nonāvēšanas laiku nosaka tādā veidā, ka *PFC* tiek skaitīts reakcijas maksimālajā punktā; apakšgrupas ietver vienādu vīrišķo un sievišķo pēcnācēju skaitu no visām devas grupām, tostarp kontroles grupām; un apakšgrupas izvērtē aptuveni vienā un tajā pašā postnatālajā vecumā.Testējamās ķīmiskās vielas iedarbība turpināsies līdz dienai pirms liesu savākšanas *PFC* reakcijai vai seruma savākšanas *ELISA* testam.

Iespējamās reproduktīvās toksicitātes turpmākais novērtējums (1B kohorta)

52. 1B kohortas dzīvnieki var tikt apstrādāti pēc 90. postnatālās dienas un pavairoti, lai vajadzības gadījumā iegūtu F_2 paaudzi. Vienas un tās pašas devas grupas tēviņiem un mātītēm ir jādzīvo kopā (izvairoties no māsu un brāļu pārošanas) ne vairāk kā divas nedēļas, sākot no 90. dienas pēc piedzimšanas vai pēc tam, bet ne vēlāk kā līdz 120. dienai pēc piedzimšanas. Ir jāievēro tās pašas procedūras, kas attiecībā uz P dzīvniekiem. Tomēr, pamatojoties uz pierādījumiem, ir iespējams, ka pietiek ar metiena nonāvēšanu 4. dienā pēc piedzimšanas tā vietā, lai strādātu ar to līdz atšķiršanai vai pēc tam.

NOBEIGUMA NOVĒROJUMI

Klīniskā bioķīmija/hematoloģija

53. Ir jāuzrauga sistēmiska ietekme uz P dzīvniekiem. Asins paraugi tukšā dūšā no noteiktas vietas tiek ņemti 10 pēc nejaušas izvēles principa atlasītiem P tēviņiem un mātītēm no katras devas grupas izmēģinājuma beigās, uzglabāti atbilstošos apstākļos un tiem tiek veikta pilna apjoma hematoloģija, klīniskā bioķīmija, *T4* un *TSH* testi vai citi izmeklējumi, ko iesaka saskaņā ar testējamās ķīmiskās vielas zināmās ietekmes profilu (sk. ESAO Norādījumu dokumentu Nr. 151 (40)). Jāpārbauda šādi hematoloģiski parametri: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācija, eritrocītu skaits, leikocītu skaits un leikocitārā formula, trombocītu skaits un asins recēšanas laiks/spēja. Plazmas vai seruma pētījumiem jāietver: glikoze, kopējais holesterīns, urīnviela, kreatinīns, kopējās olbaltumvielas, albumīns un vismaz divi fermenti, kas norāda uz hepatocelulārajām ietekmēm (piemēram, alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, alkalīnfosfatāze, gamma glutamiltranspeptidāze un sorbīta dehidrogenāze). Var iekļaut arī papildu fermentu un žultsskābju noteikšanu, kas varētu sniegt

▼M5

noderīgu informāciju pie dažiem nosacījumiem. Turklāt var paņemt asinis no visiem dzīvniekiem un glabāt, lai būtu iespēja veikt analīzes vēlāk un noskaidrot pārprotamu ietekmi vai sagatavot datus par iekšējo ekspozīciju. Ja nav paredzēta otrā P dzīvnieku pārošana, asinsanalīzes ņem tikai pirms plānotās nonāvēšanas procedūras un tās ietvaros. Ja dzīvnieki tiek saglabāti, asinsparaugi ir jāsavāc dažas dienas pirms dzīvnieku otrās pārošanas. Ja vien esošie atkārtotas devas pētījumu dati neliecina, ka testējamā ķīmiskā viela nav ietekmējusi parametru, urīna analīzes ir jāveic pirms izmēģinājuma beigām un jāvērtē šādi parametri: izskats, daudzums, osmolaritāte vai īpatnējais svars, pH, olbaltumvielas, glikoze, asins un asins šūnas, šūnas atliekas. Var savākt urīnu, lai uzraudzītu testējamās ķīmiskās vielas un/vai metabolīta(-u) izvadīšanu.

54. Ir jāuzrauga sistēmiska ietekme uz F_1 dzīvniekiem. Asins paraugi tukšā dūšā no noteiktas vietas tiek ņemti 10 nejaušināti izlasītiem 1A kohortas tēviņiem un mātītēm no katras devas grupas izmēģinājuma beigās, uzglabāti atbilstošos apstākļos, un tiem tiek veikta standarta klīniskā bioķīmija, tostarp seruma līmeņa novērtēšana vairogdziedzera hormoniem (*T4* un *TSH*), hematoloģija (eritrocītu skaits, leikocītu skaits un leikocitārā formula), kā arī urīnanalīzes novērtēšana.

55. Pārpalikušiem mazuļiem 4. dienā pēc piedzimšanas tiek veikta autopsija un apsvērta 55 izdarīt vairogdziedzera hormonu (*T4*) seruma koncentrācijas mērījumus. Vajadzības gadījumā jaundzimušo (4. diena pēc piedzimšanas) asinis var savākt pa metieniem bioķīmijas/vairogdziedzera hormonu analīzēm. Asinis tiek vāktas arī *T4* un *TSH* analīzēm no atšķirtajiem mazuļiem, kuriem paredzēts veikt autopsiju 22. dienā pēc piedzimšanas (F_1 mazuļi, kas nav atlasīti kohortām).

Spermas parametri

56. Spermas parametri ir jānosaka visiem P paaudzes tēviņiem, ja vien esošie dati neliecina, ka iedarbība uz spermas parametriem pētījuma 90. dienā nav notikusi. Spermas parametru izmeklējumi jāveic visiem 1A kohortas tēviņiem.

57. Izmēģinājuma beigās reģistrē visu 1A kohortas P un F_1 tēviņu sēklinieku un sēklinieku piedēkļu svaru. Vismaz vienu sēklinieku un sēklinieka piedēkli rezervē histopatoloģijas izmeklējumiem. Pārējos sēklinieku piedēkļus izmanto *cauda epididymis* spermas rezervju uzskaitīšanai (16) (17). Turklāt tiek izmantotas tādas *cauda epididymides* (vai *vas deferens*) spermas savākšanas metodes, kas samazina bojājumus, kuri var apgrūtināt spermas kustīguma un spermas morfoloģijas izvērtēšanu.

58. Spermas kustīgumu var izvērtēt tūlīt pēc nonāvēšanas vai reģistrēt turpmākai analīzei. Pieaugoši kustīgas spermas procentuālo daudzumu var noteikt subjektīvi vai objektīvi, izmantojot datorizētu kustīguma analīzi (19) (20) (21) (22) (23) (24). Attiecībā uz spermas morfoloģijas izvērtēšanu *cauda epididymides* (vai *vas deferens*) spermas paraugi ir jāizmeklē kā fiksēti vai mitri preparāti (25), un vismaz 200 spermatozoīdi katrā paraugā jāklasificē kā normāli (gan galviņa un centrs, gan aste šķiet normāli) vai nenormāli. Spermas morfoloģisko noviržu paraugos jāparādās saplūšanai, izolētām galviņām un kroplīgām galviņām un/vai astēm (26). Kroplīgas vai lielas spermas galviņas var norādīt uz spermas veidošanās defektiem.

59. Ja spermas paraugi ir sasaldēti, uztriepes fiksētas un spermas kustīguma analīzes attēli reģistrēti pēc autopsijas (27), turpmāko analīzi var veikt tikai kontroles grupas un lielas devas saņemošiem tēviņiem. Tomēr, ja tiek novērota ar apstrādi saistīta ietekme, jāizvērtē arī zemāku devu grupas.

▼M5

Makroskopiskā autopsija

60. Nonāvēšanas laikā vai priekšlaicīgas nāves gadījumā veic P un F_1 dzīvnieku autopsiju un makroskopiskus izmeklējumus, reģistrējot jebkuras anatomiskas novirzes vai patoloģiskas izmaiņas. Īpaša uzmanība ir jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Mirstošā stāvoklī humāni nonāvēti mazuļi un mirušie mazuļi ir jāreģistrē un, ja to audus nav skārusi autolīze, jāizmeklē attiecībā uz iespējamiem defektiem un/vai nāves cēloni un jāsaglabā.

61. P un F_1 mātīšu vaginālā uztriepe tiek izmeklēta autopsijas dienā, lai noteiktu estrālā cikla stāvokli un ļautu saistīt to ar reproduktīvo orgānu histopatoloģiju. Visu P mātīšu (un vajadzības gadījumā F_1 mātīšu) dzemdes tādā veidā, kas netraucē histopatoloģisko vērtēšanu, tiek izmeklētas, lai noteiktu implantācijas vietu klātbūtni un skaitu.

Orgānu svars un audu saglabāšana – P un F_1 pieauguši dzīvnieki

62. Nonāvēšanas laikā visu P dzīvnieku un F_1 pieaugušu dzīvnieku no attiecīgajām kohortām (kā turpmāk norādīts) ķermeņa svars un turpmāk uzskaitīto orgānu mitrais svars tiek noteikts iespējami drīz pēc sekcijas, lai izvairītos no žūšanas. Tad šie orgāni ir jāsaglabā atbilstošos apstākļos. Ja nav norādīts citādi, pāru orgānus var svērt atsevišķi vai kopā, atbilstīgi testēšanas laboratorijas iedibinātai praksei:

— dzemde (ar olvadiem un dzemdes kaklu), olnīcas,

— sēklinieki, sēklinieku piedēkļi (kopā un *cauda epididymides* paraugiem, ko izmanto spermas skaitīšanai),

— muguras un vēdera prostata. Atbrīvojot no audiem prostatu, ir jāuzmanās, lai nepārspiestu ar šķidrumu pildītos sēklas pūslīšus. Ja devu došana ir ietekmējusi kopējo prostatas svaru, pēc fiksācijas muguras un vēdera daļas rūpīgi jāatdala un jānosver atsevišķi,

— sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeriem un to šķidrumiem un prostatu (kā viena vienība),

— smadzenes, aknas, nieres, sirds, liesa, timuss, hipofīze, vairogdziedzeris (pēc fiksācijas), virsnieru dziedzeris un zināmie mērķa orgāni vai audi.

63. Papildus iepriekš uzskaitītajiem orgāniem piemērotos apstākļos jāsaglabā paraugi no perifērās nervu sistēmas, muskuļiem, muguras smadzenēm, acs un optiskā nerva, gastrointestinālā trakta, urīnpūšļa, plaušām, trahejas (ar vairogdziedzeri un epitēlijķermenīšiem), kaulu smadzenēm, *vas deferens* (tēviņiem), piena dziedzera (tēviņiem un mātītēm) un vagīnas.

64. Visu 1A kohortas dzīvnieku orgāni tiek svērti un saglabāti histopatoloģijai.

65. Izmēģinājuma beigās prenatāli un postnatāli izraisītas imūntoksicitātes ietekmes izpētei 10 vīrišķiem un 10 sievišķiem 1A kohortas dzīvniekiem no katras vielas ievadīšanas grupas (1 tēviņš un 1 mātīte no katra metiena; visus metienus pārstāv vismaz 1 mazulis; atlase izdarīta pēc nejaušas izvēles principa) tiks veiktas šādas darbības:

— to limfvadu svēršana, kas saistīti ar ievadīšanas vietu un kas ir attālu no tās (papildus virsnieru dziedzera, timusa un liesas svaram, kas jau mērīts 1A kohortas dzīvniekiem),

▼M5

— liesas limfocītu subpopulācijas analīzē (CD4+ un CD8+ T limfocīti, B limfocīti un dabīgās galētājšūnas) izmanto pusi liesas, bet otru pusi saglabā histopatoloģijas izvērtējumam.

Liesas limfocītu subpopulācijas analīzē neimunizētiem dzīvniekiem (1A kohorta) tiks noteikts, vai iedarbība ir saistīta ar pāreju uz "palīga" (CD4+) vai citotoksisku (CD8+) timusā radušos limfocītu vai dabīgu galētājšūnu (NK) (ātra reakcija uz audzēju šūnām un patogēniem) imunoloģiski stacionāra līmeņa izplatīšanos.

66. Ir jānosver šādi 1B kohortas dzīvnieku orgāni un atbilstoši audi jāapstrādā līdz uzglabāšanas stadijai:

— vagīna (nenosvērta),

— dzemde ar dzemdes kaklu,

— olnīcas,

— sēklinieki (vismaz viens),

— sēklinieku piedēkļi,

— sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeriem,

— prostata,

— hipofīze,

— noteiktie mērķa orgāni.

1B kohortas dzīvniekiem jāveic histopatoloģija, ja 1A kohortas rezultāti ir pārprotami vai gadījumos, kad ir aizdomas par reproduktīvai vai endokrīnai sistēmai toksiskām vielām.

67. 2A un 2B kohortas: ontoģenēzes neirotoksicitātes testēšana (21. vai 22. diena pēc piedzimšanas un pieauguši pēcnācēji). 2A kohortas dzīvnieki tiek nonāvēti pēc uzvedības testēšanas, reģistrējot smadzeņu svaru un pilnu neirohistopatoloģiju neirotoksicitātes novērtēšanas vajadzībām. 2B kohortas dzīvnieki tiek nonāvēti 21. vai 22. dienā pēc piedzimšanas, reģistrējot smadzeņu svaru un veicot smadzeņu mikroskopiskus izmeklējumus neirotoksiskuma novērtēšanas vajadzībām. 2A kohortas dzīvniekiem un pēc izvēles 2B kohortas dzīvniekiem ir paredzēta perfūzijas fiksācija, kā noteikta B.53. testēšanas metodē (35).

Orgānu svars un audu saglabāšana – F_1 atšķirtie mazuļi

68. Mazuļus, kurus neatlasa kohortām, tostarp nīkuļus, pēc atšķiršanas nonāvē 22. dienā pēc piedzimšanas, ja vien rezultāti neliecina, ka jāveic papildu izpēte dzīves laikā. Nonāvētajiem mazuļiem veic autopsiju, tostarp reproduktīvo orgānu novērtējumu, kā aprakstīts 62. un 63. punktā.Ir jānosver un atbilstošos apstākļos jāsaglabā smadzenes, liesa un timuss no ne vairāk kā 10 mazuļiem no katra dzimuma katrā grupā, no iespējami daudziem metieniem. Turklāt šo vīrišķo un sievišķo mazuļu krūšu audus var saglabāt, lai veiktu turpmākas mikroskopiskas analīzes ([1]) (sk. ESAO Testēšanas norādījumus 151 (40)). Makroskopiskas novirzes un mērķa audi ir jāsaglabā iespējamiem histoloģiskajiem izmeklējumiem.

([1]) Pētījumi liecina, ka piena dziedzeri, īpaši notiekot piena dziedzeru attīstībai dzīves agrīnā posmā, ir jutīgi beigupunkti estrogēna ziņā. Ieteicams, ka, apstiprinot šo testēšanas metodi, tajā tiek iekļauti beigupunkti, kas ietver abu dzimumu mazuļu piena dziedzeru izmeklējumus.

▼M5

Histopatoloģija – P dzīvnieki

69. Pilna 62. un 63. punktā uzskaitīto orgānu histopatoloģija tiek veikta visiem kontroles grupas un lielas devas saņemošiem P dzīvniekiem. Orgāni, kuros parādās ar apstrādi saistītas izmaiņas, ir jāizmeklē arī visiem dzīvniekiem mazās un vidējās devas grupās, lai palīdzētu *NOAEL* noteikšanā. Turklāt histopatoloģiskā izvērtēšana ir jāveic visiem dzīvniekiem, par kuriem ir aizdomas attiecībā uz samazinātu auglību, piemēram, tādiem, kas nav pārojušies, apaugļojušies, radījuši pēcnācējus vai dzemdējuši veselus pēcnācējus vai kuriem ir ietekmēts estrālais cikls vai spermas daudzums, kustīgums vai morfoloģija, un attiecībā uz visiem makroskopiskiem bojājumiem.

Histopatoloģija – F_1 dzīvnieki

1. kohortas dzīvnieki

70. Pilna 62. un 63. punktā uzskaitīto orgānu histopatoloģija tiek veikta visiem kontroles grupas un lielas devas saņemošiem 1A kohortas dzīvniekiem. Visi metieni ir jāpārstāv ar vismaz vienu katra dzimuma mazuli. Orgāni un audi, kuros parādās ar apstrādi saistītas izmaiņas, un visi makroskopiskie bojājumi ir jāizmeklē arī visiem dzīvniekiem mazās un vidējās devas grupās, lai palīdzētu *NOAEL* noteikšanā. Lai izvērtētu prenatāli un postnatāli izraisītu ietekmi uz limfmezgliem, ir jāveic no 10 vīrišķiem un 10 sievišķiem 1A kohortas dzīvniekiem savākto limfvadu un kaulu smadzeņu histopatoloģija pēc tam, kad jau veikta visu 1A dzīvnieku timusa, liesas un virsnieru dziedzera histopatoloģiskā izvērtēšana.

71. Visu 1B kohortas dzīvnieku reproduktīvās un endokrīnās sistēmas audiem, kas apstrādāti līdz uzglabāšanas stadijai, kā aprakstīts 66. punktā, ir jāveic histopatoloģija tajos gadījumos, kad ir aizdomas par reproduktīvai vai endokrīnai sistēmai toksiskām vielām. 1B kohortai ir jāveic histoloģiski izmeklējumi arī tad, ja 1A kohortas rezultāti ir pārprotami.

72. Pieaugušu mātīšu olnīcām jāsatur aizmetņu un augošas olšūnas, kā arī *corpora lutea*; tāpēc histopatoloģisko izmeklējumu mērķis ir veikt F_1 mātīšu kvantitatīvu aizmetņu un augošu olšūnu, kā arī *corpora lutea* izvērtējumu; dzīvnieku skaitam, olnīcu izgriezumu atlasei un autopsijas parauga lielumam jābūt statistiski atbilstošam izmantojamai vērtēšanas procedūrai. Sākumā olšūnu skaitu var noteikt kontroles un lielas devas saņemošiem dzīvniekiem, un tajos gadījumos, ja tiek novērota nelabvēlīga ietekme uz lielas devas saņemošiem dzīvniekiem, tiem nosaka mazākas devas. Izmeklējumos jāietver aizmetņu olšūnu skaita noteikšana, kuru var apvienot ar mazu augošu olšūnu skaitu, lai salīdzinātu ar devu grupas un kontroles grupas olnīcām (sk. ESAO Testēšanas norādījumus 151 (40)). *Corpora lutea* novērtējums jāveic vienlaicīgi ar estrālā cikliskuma testēšanu, lai novērtējumā varētu ņemt vērā cikla stadiju. Olvadi, dzemde un vagīna tiek izmeklēti, lai konstatētu atbilstošiem orgāniem raksturīgu attīstību.

73. F_1 tēviņiem tiek veikti sīki izstrādāti sēklinieku histopatoloģijas izmeklējumi, lai noteiktu ar apstrādi saistītu ietekmi uz sēklinieku diferenciāciju un attīstību, kā arī uz spermatoģenēzi (38). Ja iespējams, jāizmeklē *rete testis* izgriezumi. Tiek izmeklēti *epididymis caput*, *epididymis corpus* un *epididymis cauda* un *vas deferens*, lai konstatētu atbilstošu orgāniem raksturīgu attīstību, kā arī parametrus, kas noteikti P tēviņiem.

▼M5

2. kohortas dzīvnieki

74. Visiem 2A kohortas lielas devas saņemošiem un kontroles dzīvniekiem pa dzimumiem tiek veikta neirohistopatoloģija pēc tam, kad ir testēta iedarbība uz centrālo nervu sistēmu (pēc 75. dienas pēc piedzimšanas, bet ne vēlāk kā 90. dienā pēc piedzimšanas). Visiem 2B kohortas lielas devas saņemošiem un kontroles dzīvniekiem pa dzimumiem tiek veikta smadzeņu histopatoloģija 21. vai 22. dienā pēc piedzimšanas. Orgāni vai audi, kuros parādās ar apstrādi saistītas izmaiņas, ir jāizmeklē arī visiem dzīvniekiem mazākas devas grupās, lai palīdzētu *NOAEL* noteikšanā. Attiecībā uz 2A un 2B kohortas dzīvniekiem tiek pārbaudīti daudzi izgriezumi no smadzenēm, lai ļautu pārbaudīt ožas sīpolus, smadzeņu garozu, hipokampusu, bazālo gangliju, talāmu, hipotalāms, vidussmadzenes (*thecum*, *tegmentum* un smadzeņu kājiņas), smadzeņu stumbrs un smadzenītes. Attiecībā uz 2A kohortu tiek izmeklētas tikai acis (tīklene un optiskais nervs) un perifērās nervu sistēmas, muskuļu un muguras smadzeņu paraugi. Visām šīm neirohistoloģijas procedūrām ir jāatbilst B.53. testēšanas metodei (35).

75. Morfometriski (kvantitatīvi) vērtējumi jāveic tipiskās smadzeņu zonās (rūpīgi atlasot homologus izgriezumus, pamatojoties uz ticamām mikroskopiskām atšķirības iezīmēm), un tie var ietvert īpašu smadzeņu daļu lineārus un/vai areālus mērījumus. Attiecībā uz katru atšķirības iezīmi (līmeni) jāņem vismaz trīs secīgi izgriezumi, lai atlasītu to attiecīgā smadzeņu rajona izgriezumu, kurš ir pietiekami homologs un tipisks, lai vislabāk būtu derīgs vērtēšanai. Neiropatologam jāpieņem atbilstošs spriedums, vai mērījumiem sagatavotie izgriezumi ir homologi ar citiem paraugu komplektā esošajiem izgriezumiem un tāpēc piemēroti iekļaušanai, jo relatīvi neliels attālums var ietekmēt lineāros mērījumus (28).Nedrīkst izmantot nehomologus paraugus.Lai gan mērķis ir paņemt paraugus no visiem šim nolūkam rezervētajiem dzīvniekiem (10/dzimums/-devas līmenis), var pietikt arī ar mazāku skaitu.Tomēr paraugi, kas ņemti no mazāk nekā 6 dzīvniekiem/dzimums/devas līmenis, šīs testēšanas metodes vajadzībām netiek uzskatīti par pietiekamiem. Lai noteiktu ar apstrādi saistītu ietekmi uz tādiem parametriem kā īpašu neiroanatomisku rajonu tilpums vai šūnu skaits, drīkst izmantot stereoloģiju. Ir savstarpēji jālīdzsvaro visi audu paraugu sagatavošanas aspekti, sākot no audu fiksācijas un turpinot ar audu paraugu secēšanu, audu apstrādi, novietošanu uz priekšmetstikliņa, lai katrā partijā būtu reprezentatīvs paraugs no katras devas grupas. Ja ir jāizmanto morfometriskas vai stereoloģiskas analīzes, smadzeņu audi no visiem devu līmeņiem vienlaicīgi ir jāuzglabā atbilstošā līdzeklī, lai izvairītos no izžūšanas artefaktiem, kas tiek saistīta ar ilgstošu uzglabāšanu fiksācijas līdzeklī.

ZIŅOŠANA

Dati

76. Datus var iesniegt gan atsevišķi, gan apkopotus tabulā. Vajadzības gadījumā par katru testa grupu un katru paaudzi ir jāiesniedz šādi dati: dzīvnieku skaits testēšanas sākumā, testēšanas periodā mirušo vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēto dzīvnieku skaits, katra nāves vai humānās nonāvēšanas gadījuma laiks, auglīgu dzīvnieku skaits, grūsnu mātīšu skaits, atnesušos mātīšu skaits un dzīvnieku ar toksicitātes pazīmēm skaits. Ir jāiesniedz arī toksicitātes apraksts, tostarp sākums, ilgums un smagums.

77. Skaitliskie rezultāti ir jāvērtē, izmantojot piemērotu un apstiprinātu statistikas metodi. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plāna ietvaros un atbilstoši jāaplūko nenormāli dati (piemēram, skaitīšanas dati), cenzēti dati (piemēram, ierobežots novērošanas laiks), nepastāvība (piemēram, ietekme uz metienu un atkārtoti pasākumi) un nevienādas mainības. Vispārīgi

▼M5

lineāri jaukti modeļi un devas un atbildes reakcijas modeļi ietver plašu analītisko rīku klasi, kura var būt piemērota saskaņā ar šo testēšanas metodi savāktajiem datiem. Ziņojumā jāietver pietiekama informācija par analīzes metodi un izmantoto datorprogrammu, lai neatkarīgs recenzents/-statistiķis var novērtēt/atkārtoti vērtēt analīzi.

Rezultātu vērtējums

78. Konstatējumi ir jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, tostarp autopsijas un mikroskopiskus konstatējumus. Vērtējums ietver saistību vai tās trūkumu starp devu un noviržu, tostarp makroskopisku bojājumu, klātbūtni, biežumu un smagumu. Ir jānovērtē arī mērķa orgāni, auglība, klīniskās novirzes, reproduktīvie un metiena rezultāti, ķermeņa svara izmaiņas, mirstība un toksiska un attīstības ietekme. Īpaša uzmanība ir jāpievērš ar dzimumu saistītām izmaiņām. Novērtējot testa rezultātus, ir jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības un toksikokinētiskie dati, ja tie pieejami, tostarp izkļūšana cauri placentai un nonākšana pienā.

Testēšanas pārskats

79. Testēšanas pārskatā jāietver šāda informācija, kas iegūta, pētot P, F_1 dzīvniekus un F_2 dzīvniekus (vajadzības gadījumā).

Testējamā ķīmiskā viela:

— visa attiecīgā pieejamā informācija par ķīmisko vielu, testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētiskās un toksidinamiskās īpašības,

— identifikācijas dati,

— tīrība.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

— nesējvielas izvēles pamatojums, ja nesējviela nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība, materiāls migas ierīkošanai utt.,

— dzīvnieku individuālais svars testēšanas sākumā,

— P mātīšu vaginālās uztriepes dati pirms apstrādes sākšanas (ja tajā laikā tiek vākti dati),

— P paaudzes pārošanas dati, kuros norādīti sapārotie tēviņi un mātītes un pārojuma rezultāts,

— reģistrācija, kas norāda izcelsmes metienu pieaugušiem F_1 paaudzes dzīvniekiem.

Testēšanas apstākļi:

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— dati par testējamās ķīmiskās vielas preparāta/barības pagatavošanu, sasniegtās koncentrācijas,

▼M5

— preparāta stabilitāte un viendabīgums nesējvielā (piemēram, barībā, dzeramajā ūdenī), asinīs un/vai pienā, ņemot vērā izmantošanas un glabāšanas starp izmantošanas reizēm apstākļus,

— sīki dati par testējamās vielas ievadīšanu,

— attiecīgajā gadījumā testējamās vielas koncentrācijas (milj. daļas) barībā/dzeramajā ūdenī pārvēršana sasniegtajā devā (mg/kg ķermeņa svara dienā),

— dati par barības un ūdens kvalitāti (tostarp attiecīgajā gadījumā par barības sastāvu),

— sīks nejaušas izvēles procedūru apraksts attiecībā uz mazuļu atlasi izbrāķēšanai un atlasi iekļaušanai testa grupās,

— vides apstākļi,

— pētījumā nodarbināto darbinieku saraksts, tostarp profesionālā apmācība.

Rezultāti (kopsavilkums un atsevišķi dati pa dzimumiem un devām):

— barības patēriņš un, ja pieejams, ūdens patēriņš, barības efektivitāte (ķermeņa svara palielinājums uz patērētās barības gramu, izņemot kopā turēšanas periodu un laktācijas periodu) un testējamās ķīmiskās vielas patēriņš (ievadot ar barību/dzeramo ūdeni) P un F_1 dzīvniekiem,

— uzsūkšanās dati (ja pieejami),

— dati par P dzīvnieku ķermeņa svaru,

— atlasītu F_1 dzīvnieku ķermeņa svars pēc atšķiršanas,

— nāves laiks pētījuma laikā vai arī informācija, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,

— klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),

— hematoloģija, urīnanalīzes un klīniskās ķīmijas dati, tostarp *TSH* un *T4*,

— liesas šūnu (T, B, NK šūnu) fenotipiska analīze,

— šūnu veidošanās pārmaiņas kaulu smadzenēs,

— toksiskās atbildes reakcijas dati,

— P un F_1 mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,

— laiks līdz pārošanai (prekoitālie intervāli, dienu skaits starp salikšanu pārī un pārošanu),

— toksiska vai cita ietekme uz reprodukciju, tostarp to dzīvnieku skaits un procentuālā attiecība, kuriem notikusi pārošana, grūtniecība, atnešanās un laktācija, to tēviņu skaits un procentuālā attiecība, kuri izraisījuši grūtniecību, to mātīšu skaits un procentuālā attiecība, kurām novērota distocija/ilgas vai smagas atnešanās pazīmes,

— grūtniecības un vajadzības gadījumā atnešanās ilgums,

— implantācijas vietu skaits, metiena lielums un vīrišķo mazuļu procentuālā attiecība,

— pēcimplantācijas zudumu, nedzīvi piedzimušo, dzīvi piedzimušo skaits un procentuālā attiecība,

▼M5

— dati par metiena svaru un mazuļu svaru (tēviņi, mātītes un kopā), nīkuļu skaits, ja tādi ir,

— mazuļu skaits ar makroskopiskām novirzēm,

— toksiska vai cita iedarbība uz pēcnācējiem, postnatālo augšanu, dzīvotspēju utt.,

— dati par mazuļu fiziskajām atšķirībām un citi postnatālās attīstības dati,

— dati par F_1 dzīvnieku dzimumbriedumu,

— funkcionālo novērojumu dati par mazuļiem un pieaugušajiem,

— ķermeņa svars nonāvējot un dati par P un pieaugušu F_1 dzīvnieku absolūto un relatīvo orgānu svaru,

— autopsijas konstatējumi,

— sīks visu histopatoloģijas konstatējumu apraksts,

— P un F_1 tēviņu kopējais *cauda epididymal* spermas daudzums, pieaugoši kustīgas spermas procentuālais daudzums, morfoloģiski normālas spermas procentuālais daudzums un spermas ar katru identificētu novirzi procentuālais daudzums,

— P un F_1 mātīšu olnīcās konstatēto olšūnu skaits un brieduma pakāpe, vajadzības gadījumā,

— F_1 mātīšu olnīcās konstatēto *corpora lutea* skaits,

— vajadzības gadījumā rezultātu statistiskā apstrāde.

2. kohortas parametri:

— sīks izmantoto procedūru apraksts, lai standartizētu novērojumus un procedūras, kā arī darbības definīcijas, lai piešķirtu punktus novērojumiem,

— visu izmantoto testēšanas procedūru saraksts un to izmantošanas pamatojums,

— dati par uzvedības/funkcionālo, neiropatoloģijas un morfometrisko procedūru izmantošanu, tostarp informācija un dati par automātiskām ierīcēm,

— ierīču kalibrēšanas un precizitātes nodrošināšanas procedūras un vielas ievadīšanas grupu sadale pa testēšanas procedūrām,

— īss pamatojums, ar ko skaidro visus lēmumus, kuros ietverts profesionāls spriedums,

— sīks visu uzvedības/funkcionālo, neiropatoloģijas un morfometrisko konstatējumu apraksts pa dzimumiem un devas grupām, tostarp kontroles pieaugumu un samazinājumu,

— smadzeņu svars,

— visas diagnozes, kas noteiktas, konstatējot neiroloģiskas pazīmes un bojājumus, tostarp dabīgi radušās slimības vai apstākļus,

— paraugu konstatējumu attēli,

— mazjaudas attēli, lai novērtētu morfometrijai izmantoto izgriezumu homoloģiju,

▼M5

— rezultātu, tostarp datu analīzē izmantoto statistikas modeļu, kā arī citu nozīmīgu un nenozīmīgu rezultātu statistiska apstrāde,

— jebkuras citas toksiskas ietekmes saistība ar secinājumu par testējamās ķīmiskās vielas neirotoksisko potenciālu pa dzimumiem un devas grupām,

— jebkuras toksikokinētiskas informācijas ietekme uz secinājumiem,

— dati, ar kuriem pamato testēšanas metodes ticamību un jutību (t. i., pozitīvi un vēsturiski kontroles dati),

— saistība, ja tāda ir, starp neiropatoloģisku un funkcionālu ietekmi,

— *NOAEL* vai etalondeva mātītēm un pēcnācējiem pa dzimumiem un devas grupām,

— vispārējas datu interpretācijas apspriešana, pamatojoties uz rezultātiem, tostarp secinājumu, vai ķīmiskā viela ir vai nav radījusi ontoģenēzes neirotoksicitāti un *NOAEL*.

3. kohortas parametri:

— IgM antivielas titru serumā (jutīguma izraisīšana pret *SRBC* vai *KLH*) vai liesas IgM *PFC* vienības (jutīguma izraisīšana pret *SRBC*),

— optimizācijas procesa ietvaros *TDAR* metodes izmantošanas rezultāti ir jāapstiprina gan laboratorijai, kas veic testēšanu pirmo reizi, gan periodiski (piemēram, reizi gadā) visām citām laboratorijām,

— datu interpretācijas apspriešana, pamatojoties uz rezultātiem, tostarp uz secinājumu, vai ķīmiskā viela ir vai nav radījusi attīstības imūntoksicitāti un *NOAEL*.

Rezultātu apspriešana

Secinājumi, tostarp NOAEL vērtības attiecībā uz ietekmi uz vecākiem un pēcnācējiem

Ir jāsniedz arī visa tā informācija, kas nav iegūta pētījuma laikā, bet ir noderīga rezultātu (piemēram, jebkuru citu zināmu neirotoksisku vielu līdzīga iedarbība) interpretācijai.

Rezultātu interpretācija

80. Paplašinātā vienas paaudzes reproduktīvā toksiskuma pētījums sniegs informāciju par ķīmiskās vielas atkārtotas iedarbības ietekmi vajadzības gadījumā visās reproduktīvā cikla fāzēs. Jo īpaši pētījums sniedz informāciju par reproduktīvo sistēmu un par pēcnācēju attīstību, augšanu, izdzīvošanu un funkcionālajiem beigupunktiem līdz pat 90. dienai pēc piedzimšanas.

81. Pētījuma interpretācijas rezultātos jāņem vērā visa pieejamā informācija par ķīmisko vielu, tostarp fizikāli ķīmiskām, TK un toksikodinamiskām īpatnībām, pieejamā attiecīgā informācija par strukturālajiem analogiem, iepriekš veikto testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes pētījumu rezultāti (piemēram, akūts toksiskums, toksiskums pēc atkārtotas piemērošanas, mehānistiski pētījumi un pētījumi, kuros novērtē, vai ir būtiskas kvalitatīvas un kvantitatīvas atšķirības starp sugām *in vivo*/*in vitro* metabolisku īpašību ziņā). Autopsijas un orgānu svēršanas rezultāti ir jānovērtē citu atkārtotu devu pētījumos izdarītu novērojumu kontekstā. Pēcnācēju augšanas samazinājums jāaplūko saistībā ar testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz piena struktūru (29).

▼M5

2. kohorta (ontoģenēzes neirotoksicitāte)

82. Iedarbības uz centrālo nervu sistēmu un neiropatoloģijas rezultāti ir jāinterpretē visu konstatējumu kontekstā, pamatojoties uz pierādījumiem un ekspertu spriedumiem. Ir jāapspriež uzvedības vai morfoloģisku konstatējumu modeļi, ja tādi ir, kā arī pierādījumi, kas saistīti ar reakciju uz devu. Šajā raksturojumā ir jāietver ontoģenēzes neirotoksicitātes, tostarp cilvēku epidemioloģisku pētījumu vai ziņojumu, kā arī eksperimentālu dzīvnieku pētījumu novērtējums (piemēram, toksikokinētiskie dati, struktūras un darbības informācija, dati no citiem toksiskuma pētījumiem). Datu vērtējumā jāietver gan bioloģiski, gan statistiski svarīgu datu apspriešana. Vērtējumā jāietver saistība, ja tāda ir, starp novēroto neiropatoloģiju un uzvedības izmaiņām. Sīkāku informāciju par ontoģenēzes neirotoksicitātes rezultātu interpretāciju skatīt B.53. testēšanas metodē (35) un *Tyl et al.*, 2008 (31).

3. kohorta (ontoģenēzes imūntoksicitāte)

83. Imūnās funkcijas apslāpēšana vai pastiprināšana, kas novērtēta, izmantojot *TDAR* (no T šūnas atkarīgas antivielas reakcijas tests), jāizvērtē visu veikto novērojumu kontekstā. *TDAR* testa rezultātam ir liela nozīme, jo tas var liecināt par cita veida ietekmi uz rādītājiem, kas saistīti ar imunoloģiju (piemēram, šūnu veidošanās pārmaiņas kaulu smadzenēs, limfaudu svars un histopatoloģija, limfocītu apakškopas izplatīšanās). *TDAR* testā konstatētā ietekme var būt mazāk nozīmīga, ja citas toksiskuma pazīmes novēro mazākas iedarbības koncentrācijas gadījumā.

84. ESAO Testēšanas norādījumi 43 jāizmanto kā palīglīdzeklis, interpretējot reproduktīvās sistēmas un neirotoksiskuma izpētes rezultātus (26).

LITERATŪRA

(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. 319. – 333. lpp.

(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) Šā pielikuma B.43. nodaļa 'Žurku neirotoksicitātes pētījums'

(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) Šā pielikuma B.53. nodaļa 'Ontoģenēzes neirotoksicitātes pētījums'.

(36) Šā pielikuma B.54. nodaļa 'Uterotropais biotests ar grauzējiem: estrogēno īpašību īsā skrīninga tests'.

(37) Šā pielikuma B.55. nodaļa 'Heršbergera biotests ar žurkām: (anti)androgēno īpašību īsā skrīninga tests'.

▼**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. papildinājums

Funkcionālo novērojumu sērijā ietvertie pasākumi un novērojumi (2A kohorta)

Turēšanas būris un atklāta telpa	Manipulatīvs	Fizioloģisks
Stāja	Pārvietošanas vieglums	Temperatūra
Netīšas kloniskās un toniskās kustības	Aprūpes vieglums	Ķermeņa svars
Plakstiņu aizvēršanās	Muskuļu tonuss	Acu zīlītes reakcija
Piloerekcija	Reakcija uz tuvošanos	Acu zīlītes lielums
Siekalošanās	Reakcija uz pieskārienu	
Asarošana	Reakcija uz skaņu	
Skaņas	Reakcija uz pieskārienu astei	
Sliešanās uz pakaļkājām	Līdzsvara noturēšana	
Novirzes gaitā	Pēdu griešana uz ārpusi	
Uzbudinājums	Priekšķepas tvēriena spēks	
Stereotipi	Pakaļķepas tvēriena spēks	
Dīvaina uzvedība		
Plankumi		
Elpceļu novirzes		

▼**M5**

2. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķīmiska viela: Viela vai maisījums.

Testējamā ķīmiskā viela: Jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M5

B.57. **H295R STEROĪDĢENĒZES TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 456 (*TG*) (2011. gads). ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādātu jaunas testēšanas vadlīnijas par potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķīmisko vielu noteikšanu un testēšanu. ESAO 2002. gada dokuments 'Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim (1). Šajā testēšanas metodē aprakstītajā *in vitro* H295R steroīdģenēzes testā (H295R) izmanto cilvēka virsnieru karcinomas šūnu līniju (NCI-H295R šūnas), un tā ir 2. līmeņa '*in vitro* tests, kas sniedz mehānistiskus datus', kuri izmantojami skrīningam un prioritizēšanai. Šis ir daudzpakāpju procesā izstrādāts un standartizēts skrīninga tests, kurā nosaka ķīmisko vielu ietekmi uz steroīdģenēzi, konkrētāk, uz 17β-estradiola (E2) un testosterona (T) producēšanos. H295R tests ir optimizēts un validēts (2) (3) (4) (5).

2. H295R steroīdģenēzes testa mērķis ir noteikt ķīmiskas vielas, kas ietekmē E2 un T producēšanos. H295R tests ir paredzēts tam, lai noteiktu ksenobiotiķus, kuri iedarbojas uz endogēnām sastāvdaļām šūnas bioķīmiskajā ceļā, kas aizsākas reakciju sekvencē, kurā no holesterīna rodas E2 un/vai T. Ar H295R testu nav paredzēts noteikt ķīmiskas vielas, kas steroīdģenēzi ietekmē caur hipotalāma-hipofīzes-gonādu (*HPG*) asi. Testa mērķis ir gūt apstiprinošu vai noliedzošu atbildi (JĀ/NĒ) attiecībā uz ķīmiskās vielas spēju inducēt vai inhibēt T un E2 producēšanos; tomēr dažos gadījumos var gūt kvantitatīvus rezultātus (sk. 53. un 54. punktu). Testa rezultātus izsaka kā hormonu producēšanās relatīvās izmaiņas salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroliedobēm (*SC*). Testa mērķis nav sniegt konkrētu mehānistisku informāciju par testējamās ķīmiskās vielas mijiedarbību ar endokrīno sistēmu. Pētījums ar šūnu līniju veikts, lai noteiktu iedarbību uz noteiktiem enzīmiem un hormoniem, kas ir starpprodukti, piemēram, progesteronu (2).

3. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti papildinājumā. Detalizēts protokols ar norādījumiem par to, kā gatavo šķīdumus, kultivē šūnas un dažādos aspektos veic testu, ir pieejams ESAO dokumenta 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' I-III papildinājumā (4).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. Steroīdo dzimumhormonu sintēzē piedalās pieci dažādi enzīmi, kas katalizē sešas dažādas reakcijas. Citohroma P450 holesterīna sānu ķēdes šķēlējenzīms CYP11A holesterīnu enzimātiskā ceļā pārveido par pregnenolonu, un tas ir pirmais solis bioķīmisku reakciju ķēdē, kurā visbeidzot tiek sintezēti steroīdie galaprodukti. Atkarībā no nākamo divu reakciju secības steroīdģenēzes ceļš sadalās Δ^5-hidroksisteroīdceļā un Δ^4-ketosteroīdceļā, kas satiekas androstendiona producēšanā (1. att.).

5. Androstendionu ar 17β-hidroksisteroīda dehidrogenāzes starpniecību (17β-HSD) pārveido par testosteronu (T). Testosterons ir hormons, kas izstrādājas gan kā starpprodukts, gan kā galaprodukts. Androgēniskas darbības mērķaudu – piemēram, prostatas un sēklas pūslīšu – šūnu membrānās, kodolapvalkos un endoplazmatiskajā tīklā tēviņu organisma T ar 5α-reduktāzes starpniecību var pārveidoties par dihidrotestosteronu (DHT). DHT ir daudz spēcīgāks androgēns nekā T, un arī to uzskata par hormonu, kas ir galaprodukts. H295R testā DHT netiek mērīts (sk. 10. punktu).

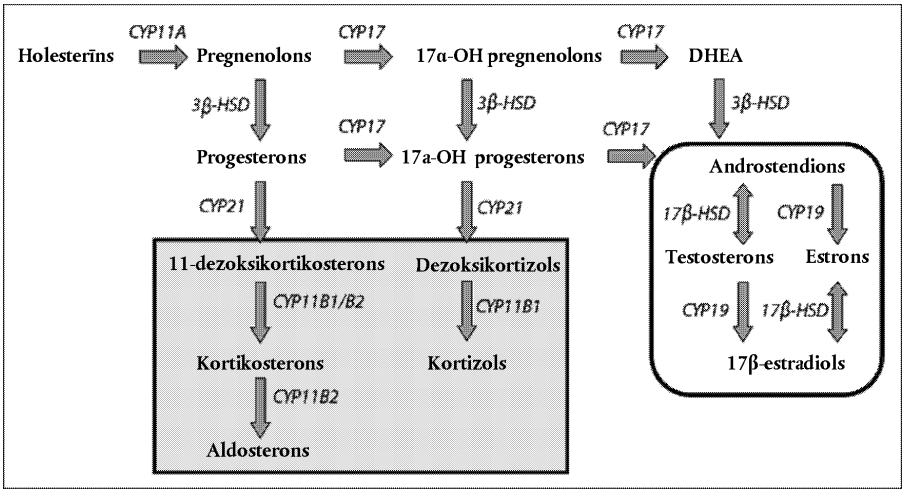
▼M5

6. Steroīdģenēzes ceļa enzīms, ar kura palīdzību androgēniskas ķīmiskās vielas tiek pārveidotas estrogēniskās ķīmiskās vielās, ir aromatāze (CYP19). CYP19 pārveido T par 17β-estradiolu (E2) un androstendionu par estronu. Hormonus E2 un T uzskata par steroīdģenēzes ceļa galaproduktiem.

7. Dažādu sugu starpsubstrātiem CYP17 liāzes darbības specifiskums ir atšķirīgs. Cilvēka organismā šis enzīms dod priekšroku Δ^5-hidroksisteroīdceļa (pregnenolona) substrātiem, savukārt žurkas organismā (19) – Δ^4-ketosteroīdceļa (progesterona) substrātiem. Šādas atšķirības CYP17 liāzes darbībā var izskaidrot dažas sugu atšķirības reaģēšanā uz ķīmiskām vielām, kas *in vivo* maina steroīdģenēzi (6). Ir pierādīts, ka līnijas H295 šūnas ļoti precīzi atspoguļo pieauguša cilvēka virsnieru enzīmu ekspresijas un steroīdu producēšanās modeli (20), taču ir zināms, ka androgēnu sintēzes enzīmu ekspresija tajās notiek gan Δ^5-hidroksisteroīdceļā, gan Δ^4-ketosteroīdceļā (7) (11) (13) (15).

1. attēls

Steroīdģenēzes ceļš H295R šūnās



Piezīme.

Enzīmi ir norādīti kursīvā, hormoni – treknrakstā, savukārt ar bultām ir norādīts sintēzes virziens. Ar pelēku fonu apzīmēti kortikosteroīdu ceļi/produkti. Steroīdo dzimumhormonu ceļi/produkti ir apvilkti ar apli. *CYP* = citohroms P450; HSD = hidroksisteroīda hidrogenāze; DHEA = dehidroepiandrosterons.

8. Cilvēka H295R virsnieru karcinomas šūnu līnija ir izdevīgs *in vitro* modelis, kurā pētīt ietekmi uz steroīdhormonu sintēzi (2) (7) (8) (9) (10). Šūnu līnijā H295R tiek ekspresēti gēni, kas iepriekš minētajā steroīdģenēzē (11) (15) kodē visus galvenos enzīmus (1. attēls). Tā ir unikāla īpašība, jo šo gēnu ekspresija *in vivo* ir atkarīga no audu veida un attīstības stadijas, un parasti nenotiek tā, ka kādos audos vai kādā atsevišķā attīstības stadijā tiktu ekspresēti visi steroīdģenēzē iesaistītie gēni (2). H295R šūnas pēc fizioloģiskajām īpašībām ir identiskas zonāli nediferencētām cilvēka augļa virsnieru dziedzera šūnām (11). Šīs šūnas ir unikāla *in vitro* sistēma, jo spēj producēt visus pieauguša cilvēka virsnieru garozā un gonādās sastopamos steroīdhormonus, tādējādi, lai gan tests ir validēts tikai T un E2 noteikšanai, ar tām iespējams testēt gan to, kā ietekmēta kortikosteroīdu sintēze, gan steroīdo dzimumhormonu, piemēram, androgēnu un estrogēnu, producēšanās. Testēšanas sistēmas konstatētās pārmaiņas, kas izpaužas kā T un E2 producēšanās pārmaiņas, var būt radušās ļoti daudzveidīgā testējamo ķīmisko vielu mijiedarbībā ar H295R šūnām raksturīgajām steroīdģenēzes funkcijām. To

▼M5

vidū ir steroīdhormonu producēšanā, transformācijā vai izvadīšanā iesaistīto enzīmu ekspresijas, sintēzes vai darbības modulācijas (12) (13) (14). Inhibētas hormonu producēšanās iemesli var būt tieša konkurējoša saistīšanās ar kādu no ceļa enzīmiem, ietekme uz tādiem līdzfaktoriem kā *NADPH* (nikotīnamīdadenīna dinukleotīdfosfāts) un *cAMP* (cikliskais adenozīnmonofosfāts) un/vai pastiprinājusies steroīdu metabolizēšanās vai nomākta dažu par steroīdģenēzes ceļa enzīmiem atbildīgu gēnu ekspresija. Inhibēšanās var notikt gan tiešos, gan netiešos ar hormonu producēšanos saistītos procesos, savukārt inducēšanās parasti ir netieša, piemēram, to ietekmē tādi līdzfaktori kā *NADPH* un *cAMP* (kā tas ir ar forskolīnu), steroīdu metabolizēšanās samazinājums (13) un/vai par steroīdģenēzi atbildīgā gēna ekspresijas pastiprināšanās.

9. H295R testam ir vairākas priekšrocības:

— ar to ir iespējams gan attiecībā uz T, gan attiecībā uz E2 konstatēt gan producēšanās pieaugumu, gan samazināšanos,

— ar to iespējams tieši novērtēt kādas ķīmiskās vielas iespējamo ietekmi uz šūnu dzīvotspēju/citotoksicitāti. Tā ir svarīga īpašība, jo atšķirībā no audu eksplantu sistēmām, ko veido vairāku tipu šūnas ar atšķirīgu jutīgumu un funkcijām, paver iespēju citotoksicitātes sekas nošķirt no sekām, ko izraisījusi ķīmisko vielu tieša mijiedarbība ar steroīdģenēzes ceļiem,

— tajā nevajag izmantot dzīvniekus,

— šūnu līnija H295Rir tirdzniecībā pieejama.

10. Testa galvenie ierobežojumi ir šādi:

— attiecīgā metaboliskā spēja nav zināma, taču, domājams, ir samērā ierobežota; tāpēc, visdrīzāk, šajā testā netiks pamanītas ķīmiskās vielas, ko aktivizē vielmaiņas process,

— H295R šūnas ir atvasinātas no virsnieru dziedzera audiem, attiecīgi to enzīmi spēj producēt gan glikokortikoīdus, gan minerālkortikoīdus, gan arī dzimumhormonus; tāpēc testā novērotos T un E2 līmeņus varētu ietekmēt tas, ka ir ietekmēta glikokortikoīdu un minerālkortikoīdu producēšanās,

— tajā netiek mērīts DHT un tāpēc nav domājams, ka ar to varētu noteikt, vai ķīmiskā viela inhibē 5α-reduktāzi. Minētajā gadījumā var izmantot Heršbergera testu (16),

— ar H295R testu nevarēs noteikt ķīmiskas vielas, kas steroīdģenēzi ietekmē ar hipotalāma-hipofīzes-gonādu (*HPG*) ass starpniecību, jo to iespējams pētīt tikai ar dzīviem dzīvniekiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testa mērķis ir noteikt ķīmiskas vielas, kas ietekmē T un E2 producēšanos. T ir arī E2 producēšanās ceļa starpprodukts. Ar šo testu iespējams noteikt ķīmiskās vielas, kas parasti inhibē vai inducē steroīdģenēzes ceļa enzīmus.

▼M5

12. Testu parasti veic standarta šūnu kultūras apstākļos ar 24 iedobju platēm. Testam var izmantot cita izmēra plates; tomēr attiecīgi būtu jākoriģē uzsēšanas un eksperimentu nosacījumi, lai nodrošinātu, ka joprojām tiek ievēroti veiktspējas kritēriji.

13. Pēc 24 stundu aklimatizācijas perioda vairākiedobju platēs vismaz trīskārt replicētus šūnu paraugus 48 stundas eksponē septiņām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām. Negatīvajai un pozitīvajai kontrolei noteiktās koncentrācijās izmanto šķīdinātāju, kādu zināmu hormonu producēšanās inhibētāju un tādu pašu inducētāju. Pēc eksponēšanas beigām barotni no visām iedobēm izņem. Tūlīt pēc barotnes izņemšanas analizē katras iedobes šūnu dzīvotspēju. Hormonu koncentrāciju barotnē var mērīt ar dažādām metodēm, arī ar tirdzniecībā pieejamiem hormonu līmeņa mērīšanas komplektiem un/vai aparātmetodēm, piemēram, šķidrumhromatogrāfijumasspektrometriju (*LC-MS*). Datus izsaka izmaiņu kārtās attiecībā pret kontroliedobi ar šķīdinātāju un zemākās novērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*). Ja testā iegūts negatīvs rezultāts, augstāko testēto koncentrāciju pārskatā norāda kā nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*NOEC*). Secinājumiem par ķīmiskas vielas spēju ietekmēt steroīdģenēzi būtu jābalstās uz vismaz divām neatkarīgām testa izpildēm. Pirmo testa izpildi var izmantot par diapazona noteikšanas testu, un attiecīgā gadījumā – ja rodas problēmas ar šķīdību vai citotoksicitāti vai ja šķiet, ka ķīmiskās vielas iedarbība vērojama testēto koncentrāciju diapazona galā, – pēc tam otrajā un trešajā izpildē koncentrācijas koriģē.

ŠŪNU AUDZĒŠANAS PROCEDŪRA

Šūnu līnija

14. Līnijas NCI-H295R šūnas var komerciāli iegādāties no Amerikas tipveida kultūru kolekcijas (*ATCC*), parakstot nolīgumu par materiālu nodošanu (*MTA*) ([1]).

Ievads

15. Tā kā, šūnām novecojot/augot to pasāžām (2), to spēja producēt E2 mainās, pirms izmantošanas tās jāaudzē saskaņā ar īpašu protokolu un jānorāda pasāžu skaits kopš šūnu atlaidināšanas, kā arī, pēc cik pasāžām šūnas tikušas sasaldētas un novietotas glabāšanai šķidrajā slāpeklī. Pirmais skaitlis ir faktiskās šūnu pasāžas kārtas skaitlis un otrais – tās pasāžas kārtas skaitlis, kurā šūnas tikušas sasaldētas un novietotas glabāšanā. Piemēram, ja šūnas sasaldē pēc piektās pasāžas un pēc tam koloniju trīs reizes sadala (4 pasāžas, ja svaigi atlaidinātās šūnas uzskata par pirmo pasāžu), tad pēc atkārtotas izaudzēšanas tās marķē ar 4.5. Numerācijas shēmas paraugs sniegts validācijas pārskata I papildinājumā (4).

16. Par papildināto barotņu un sasaldēšanas barotņu pamatu izmanto barotnes izejmateriālu. Papildinātās barotnes ir nepieciešamas šūnu audzēšanā. Sasaldēšanas barotne ir īpaši izstrādāta tā, lai bez kaitīgām sekām būtu iespējama šūnu sasaldēšana ilgstošai glabāšanai. Pirms izmantošanas jāizanalizē T un E2 fona koncentrācija vienā no papildinātās barotnes sastāvdaļām *Nu-serum* (vai serumā ar līdzvērtīgām īpašībām, attiecībā uz kuru ir pierādīts, ka ar to var iegūt testēšanas veiktspējas un kvalitātes kontroles prasībām atbilstošus datus). Šo šķīdumu gatavošana ir aprakstīta validācijas pārskata (4) II papildinājumā.

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Pēc tam, kad H295R šūnu kultūra ir ieaudzēta no sākotnējās *ATCC* partijas, šūnas būtu jāaudzē piecas pasāžas (proti, šūnu kopumu sadala četras reizes). Pēc tam piektās pasāžas šūnas sasaldē šķidrā slāpeklī uzglabāšanai. Pirms šūnas sasaldēt, kvalitātes kontroles platē izaudzē iepriekšējās, ceturtās pasāžas, šūnu paraugu (sk. 36. un 37. punktu), lai pārbaudītu, vai hormonu pamatproducēšanās un reaģēšana uz pozitīvās kontroles ķīmiskajām vielām apmierina 5. tabulā definētos testa kvalitātes kontroles kritērijus.

18. H295R šūnas ir jāaudzē un pēc tam šķidrā slāpeklī jāsasaldē un jāglabā, nodrošinot, ka audzēšanai un lietošanai ir pastāvīgi pieejamas piemērotas pasāžas/vecuma šūnas. Pēc tam, kad jauna ([1]) vai sasaldēta ([2]) šūnu partija ievadīta H295R testam piemērotā barotnē, maksimālais pasāžu skaits nedrīkstētu pārsniegt 10. Piemēram, attiecībā uz šūnu kultūrām no piektajā pasāžā sasaldētas partijas pieņemams pasāžu skaits būtu no 4.5. līdz 10.5. pasāžai. Attiecībā uz šūnām, ko sāk audzēt no sasaldētajām partijām, jāievēro 19. punktā aprakstītā procedūra. Pirms šīs šūnas izmantot testā, no tām būtu jāizaudzē vismaz četras (4) papildu pasāžas (4.5. pasāža).

Šūnu audzēšana no sasaldēta izejmateriāla

19. No glabāšanas šķidrajā slāpeklī izņemot jaunu audzēšanai un testēšanai paredzētu šūnu partiju, jāievēro procedūra, ko izmanto šūnu audzēšanai no sasaldēta izejmateriāla. Šī procedūra ir detalizēti aprakstīta validācijas pārskata (4) III papildinājumā. Šūnas izņem no šķidrā slāpekļa glabātuves, strauji atlaidina, novieto centrifūgas mēģenē ar papildinātu barotni, istabas temperatūrā centrifugē, papildinātā barotnē atkārtoti suspendē un pārvieto uz šūnu kultūru kolbām. Nākamajā dienā barotne jāmaina. H295R līnijas šūnas kultivē inkubatorā 37 °C temperatūrā pie CO_2 koncentrācijas gaisā 5 %, un barotni 2–3 reizes nedēļā atjaunina. Kad šūnas ir apmēram par 85–90 % konfluentas, to kopumu ieteicams sadalīt. Šūnu sadalīšana ir nepieciešama, lai nodrošinātu, ka šūnas ir veselīgas un aug, un lai šūnas uzturētu piemērotas bioloģisko testu veikšanai. Šūnas trīs reizes skalo ar fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (*PBS* bez Ca^{2+} Mg^{2+}) un atdala no kultūru kolbas sienām, fosfātu fizioloģiskajam šķīdumam (bez Ca^{2+} Mg^{2+}) pievienojot attiecīgu atdalīšanos veicinošu enzīmu, piem., tripsīnu. Tūlīt pēc tam, kad šūnas atdalījušās no kultūru kolbas sienām, enzīma darbība būtu jāaptur, pievienojot papildinātu barotni, kuras apjoms trīsreiz pārsniedz enzīmu apstrādei izmantoto tilpumu. Šūnas ievieto centrifūgas mēģenē, istabas temperatūrā centrifugē, nolej supernatantu un šūnu nogulas papildinātajā barotnē atkārtoti suspendē. Attiecīgu šūnu šķīduma daudzumu ievieto jaunajā kultūru kolbā. Šūnu šķīduma daudzumu ieteicams koriģēt tā, lai pēc 5–7 dienām šūnas būtu konfluentas. Ieteicamā apakškultūru proporcija ir no 1:3 līdz 1:4. Plate rūpīgi jāmarķē. Tagad šūnas ir gatavas izmantošanai testā, un to pārpalikumu ieteicams sasaldēt šķidrajā slāpeklī, kā aprakstīts 20. punktā.

([1]) "Jauna partija" ir svaigu no *ATCC* saņemtu šūnu partija.

([2]) "Sasaldēta partija" ir tādu šūnu partija, kas izaudzētas un tad sasaldētas citā laboratorijā, nevis *ATCC*.

▼M5

H295R šūnu sasaldēšana (šūnu sagatavošana glabāšanai šķidrajā slāpeklī)

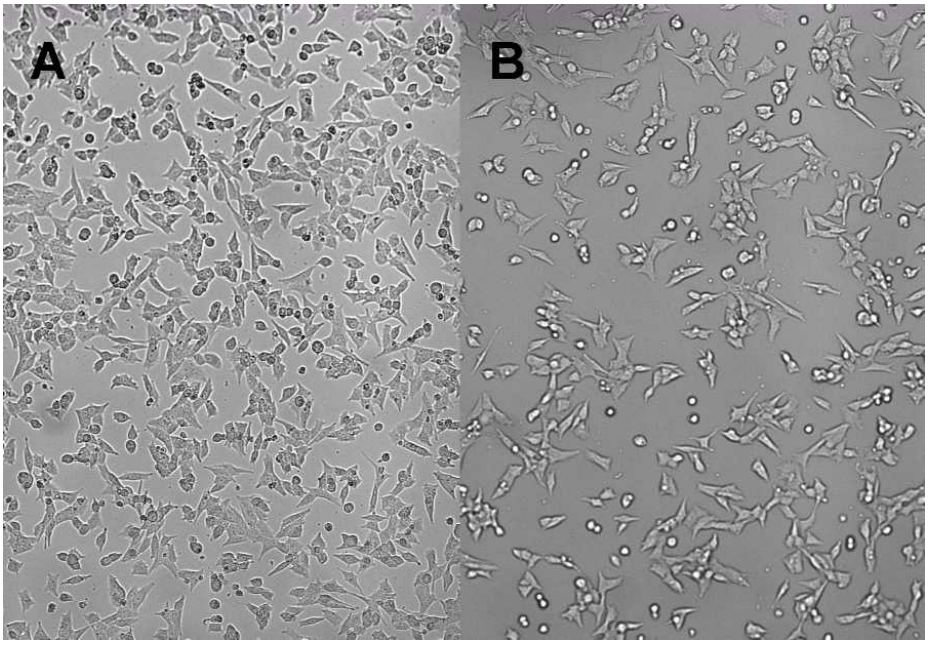
20. Lai līnijas H295R šūnas sagatavotu sasaldēšanai, iepriekš aprakstītā šūnu koloniju atdalīšanas procedūra jāievēro līdz solim, kur notiek centrifūgas mēģenes apakšā nogulsnējušos šūnu atkārtota suspendēšana. Tajā brīdī šūnu nogulas atkārtoti suspendē sasaldēšanas barotnē. Šķidrumu pārlej kriogēnajā kivetē, attiecīgi marķē un – 80 °C 24 stundas saldē, kiveti pēc tam novietojot glabāšanai šķidrajā slāpeklī. Šī procedūra ir detalizēti aprakstīta validācijas pārskata (4) III papildinājumā.

Testa šūnu ievietošana platēs un pirmsinkubācijas posms

21. Cik būs nepieciešams 24 iedobju plašu, kas sagatavotas saskaņā ar 19. punktu, ir atkarīgs no testējamo ķīmisko vielu skaita un no šūnu konfluences kultūru traukos. Parasti no vienas kultūru kolbas (75 cm^2), kurā šūnu konfluence ir 80–90 %, var iegūt šūnu daudzumu, ar ko pietiek vienai līdz pusotrai (24 iedobju) platei ar mērķblīvumu 200 000 līdz 300 000 šūnu uz barotnes mililitru – tādā veidā 24 stundu laikā iedobēs iegūstama apmēram 50–60 % konfluence (2. attēls). Tāds šajā testā parasti ir optimālais šūnu blīvums, kādā notiek hormonu producēšanās. Ja šūnu blīvums ir augstāks, gan T, gan E2 producēšanās modeļi mainās. Pirms testu veikt pirmo reizi, ieteicams testēt dažāda blīvuma uzsējumus, no 200 000 līdz 300 000 šūnu uz ml, un tālākiem eksperimentiem jāizraugās blīvums, ar kādu 24 stundu laikā iedobē iegūst 50–60 % konfluenci.

2. attēls

Stāvoklis, kas iegūts pēc 24 stundām no 24 iedobju kultūru platē uzsētām H295R līnijas šūnām ar blīvumu 50 %, mikrofotoattēls pie iedobes malas (A) un centrā (B).



22. Barotni ar pipeti izņem no kultūru kolbas, un šūnas trīs reizes noskalo ar sterilu *PBS* (bez $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Lai šūnas atdalītu no kultūru kolbas sienām, tajā pievieno enzīmu šķīdumu (fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā). Kad šūnu atdalīšanās procesā pagājis pietiekams laiks, enzīma darbība būtu jāaptur, pievienojot papildinātu barotni, kuras apjoms trīsreiz pārsniedz

▼M5

enzīmu apstrādē izmantoto tilpumu. Šūnas ievieto centrifūgas mēģenē, istabas temperatūrā centrifugē, nolej supernatantu un šūnu nogulas papildinātajā barotnē atkārtoti suspendē. Šūnu blīvumu aprēķina, piemēram, ar hemocitometru vai šūnu skaitītāju. Šūnu šķīdums būtu jāatšķaida līdz blīvumam, kas vēlams ievietošanai platē, un rūpīgi jāsamaisa, lai nodrošinātu šūnu blīvuma homogenitāti. Šūnas būtu jāuzsēj, uz iedobi izmantojot 1 ml šūnu šķīduma, un plates un iedobes jānumurē. Plates ar uzsējumu 24 stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie CO_2 koncentrācijas gaisā 5 %, lai šūnas iedobēs varētu pielipināties.

KVALITĀTES KONTROLES PRASĪBAS

23. Ir ļoti svarīgi, lai devu ievadīšanas laikā iedobēs nonāktu precīzs šķīdumu un paraugu tilpums, jo no šiem tilpumiem ir atkarīgas testa rezultātu aprēķināšanā izmantotās koncentrācijas.

24. Pirms sākt ieaudzēt šūnu kultūras un ar tām veikt jebkādus testus, katrai laboratorijai būtu jāpierāda tās izmantotās hormonu līmeņa mērīšanas sistēmas jutība (29.–31. punkts).

25. Ja paredzēts izmantot uz antivielu metodēm balstītus hormonu līmeņa mērīšanas testus, pirms sākt testēšanu, ir jāanalizē testējamo ķīmisko vielu iespējamā interference ar hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu, kas izmantota T un E2 kvantitatīvā noteikšanā, kā minēts 32. punktā.

26. Testā par šķīdinātāju ieteicams izmantot DMSO (dimetilsulfoksīdu). Ja izmanto alternatīvu šķīdinātāju, jānosaka šādi faktori:

— testējamās ķīmiskās vielas, forskolīna un prohlorāzes šķīdība šķīdinātājā un

— citotoksicitāte, to izsakot kā šķīdinātāja koncentrācijas funkciju.

Pieļaujamai maksimālai šķīdinātāja koncentrācijai nav ieteicams pārsniegt šķīdinātāja vismazāk toksiskās koncentrācijas desmitkārtēju atšķaidījumu.

27. Pirms testēšanu veikt pirmo reizi, laboratorijai, kā aprakstīts 33.–35. punktā, būtu jāveic kvalifikācijas eksperiments, kurā pierāda, ka laboratorija spēj uzturēt un sasniegt attiecīgos ķīmisko vielu testēšanai nepieciešamos šūnu kultivēšanas un eksperimentu apstākļus.

28. Pirms testēšanā sāk izmantot jaunu partiju, nepieciešama izpilde ar kontroles plati, lai izvērtētu šūnu rādītājus, kā aprakstīts 36. un 37. punktā.

Hormonu līmeņa mērīšanas sistēmas veiktspēja

Metodes jutība, pareizība, precizitāte un šķērsreaktivitāte ar parauga matrici

29. Katra laboratorija var izvēlēties, kādu hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu izmantot, lai analizētu T un E2 producēšanos H295R līnijas šūnās, taču šai metodei jāatbilst veiktspējas kritērijiem, arī kvantitatīvās noteikšanas robežas (*LOQ*) kritērijam. Nominālvērtības ir 100 pg/ml attiecībā uz T un 10 pg/ml attiecībā uz E2, to pamatā ir validācijas pētījumos novērotie hormonu producēšanās pamatlīmeņi. Tomēr atkarībā no testa veicējas laboratorijas panāktajiem hormonu producēšanās pamatlīmeņiem var būt lietderīgi izmantot augstāku vai zemāku līmeni. Pirms sākt testēt kvalitātes kontroles plati un izpildīt pašu testu, laboratorijai jāpierāda, ka izmantojamā hormonu testā hormonu koncentrācijas mērīšanas pareizība un precizitāte ir pietiekama, lai, analizējot papildinātu barotni, kurai pievienota iekšēja hormona kontroldeva, tiktu apmierināti 1. un 5. tabulā norādītie *QC* kritēriji. Papildinātajā barotnē katrs hormons būtu jāanalizē, zināmu tā devu pievienojot vismaz trīs koncentrācijās (piem., par zemākajām pievienotās devas koncentrācijām attiecībā uz T var izmantot 100, 500 un 2 500 pg/ml, attiecībā uz E2 – 10, 50 un 250 pg/ml, vai var izmantot tādas zemākās iespējamās koncentrācijas, kas balstās uz izraudzītās hormonu līmeņa mērīšanas

▼M5

noteikšanas robežām). Neekstrahētos paraugos mērītajām hormonu koncentrācijām vajadzētu būt 30 % nominālās koncentrācijas robežās, un viena un tā paša parauga replicēto mērījumu variācija nedrīkstētu pārsniegt 25 % (*QC* papildkritērijus sk. arī 8. tabulā). Ja šie *QC* kritēriji ir apmierināti, tiek uzskatīts, ka izraudzītais hormonu līmeņa mērīšanas tests ir pietiekami pareizs, precīzs un ka tajā nav vērojama tāda šķērsreaktivitāte ar barotnes sastāvdaļām (parauga matrici), kas varētu būtiski ietekmēt testa iznākumu. Šajā gadījumā, pirms mērīt hormonu līmeni, paraugi nav jāekstrahē.

30. Ja 1. un 8. tabulas *QC* kritēriji nav izpildīti, iespējams, ka būtisku ietekmi rada matrice, un ieteicams veikt eksperimentu ar ekstrahētu barotni, kam pievienota zināma deva. Ekstrakcijas procedūras paraugs sniegts validācijas pārskata (4) II papildinājumā. Ekstrahētajos paraugos hormonu koncentrācija jāmēra trim identiskiem paraugiem ([1]). Ja iespējams pierādīt, ka pēc ekstrahēšanas, vērtējot pēc *QC* (kvalitātes kontroles) kritērijiem, barotnes sastāvdaļas neinterferē ar hormonu noteikšanas metodi, visi turpmākie eksperimenti jāveic ar ekstrahētiem paraugiem. Ja pēc ekstrahēšanas atbilstību *QC* kritērijiem nodrošināt nav iespējams, izmantotā hormonu līmeņa mērīšanas sistēma H295R steroīdģenēzes testa nolūkam nav piemērota un jāizmanto alternatīva hormonu noteikšanas metode.

Standartlīkne

31. Šķīdinātāja kontroliedobēs (*SC*) hormonu koncentrācijai jāatbilst standartlīknes lineārajai daļai. Ieteicams, lai *SC* vērtības būtu tuvu lineārās daļas centram, kas nodrošina iespēju mērīt hormonu sintēzes inducēšanos un inhibēšanos. Attiecīgi jāizraugās līmeņa mērīšanai paredzētie barotnes šķīdumi (vai ekstrakti). Lineārā sakarība ir nosakāma ar piemērotu statistisku pieeju.

Ķīmisko vielu inteferences tests

32. Ja hormonu līmeņa mērīšanai tiks izmantoti antivielu testi, piemēram, imūnfermentatīvā analīze (*ELISA* testi) un radioimunoloģiskā metode (*RIA* testi), pirms sākt ķīmisko vielu faktisko testēšanu, ir jātestē katras ķīmiskās vielas iespējamā interference ar paredzēto hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu (validācijas pārskata (4) III papildinājums), jo ķīmisko vielu interference ar šiem testiem ir iespējama (17). Ja hormonu analīzē noteiktā interference ir ≥ 20 % no hormonu T un/vai E2 pamatproducēšanās, ar visām testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu koncentrācijām būtu jāizpilda Ķīmisko vielu interferences tests ar hormonu testu (aprakstīts validācijas pārskata (4) 5.0. sadaļas III papildinājumā), lai noteiktu robeždevu, pie kuras rodas būtiska (≥ 20 %) interference. Ja interference nesasniedz 30 %, rezultātus var

([1]) *Piezīme.* Ja nepieciešama ekstrahēšana, katram ekstraktam veic trīs replicētus mērījumus. Katru paraugu ekstrahē tikai vienu reizi.

▼M5

koriģēt attiecībā uz interferenci. Ja interference pārsniedz 30 %, dati par šīm koncentrācijām nav derīgi un ir jāatmet. Ja būtiska testējamās ķīmiskās vielas interference ar hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu ir vērojama vairāk nekā vienā koncentrācijā, pie kuras nav liecību par citotoksicitāti, jāizmanto cita hormonu līmeņa mērīšanas sistēma. Lai izvairītos no interferences ar piesārņojošām ķīmiskām vielām, hormonus no barotnes ieteicams ekstrahēt ar piemērota šķīdinātāja starpniecību, un iespējamās metodes ir norādītas validācijas pārskatā (4).

1. tabula

Hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu veiktspējas kritēriji

Parametrs	Kritērijs
Mērīšanas metodes jutība	Kvantitatīvās noteikšanas robeža T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Hormonu ekstrahēšanas efektivitāte (tikai gadījumos, kur ekstrahēšana nepieciešama)	Vidējais atgūstamības līmenis (pamatojoties uz trīs identisku paraugu mērījumiem) mērījumos ar pievienotu zināmu hormona devu no pievienotā daudzuma nedrīkst atšķirties vairāk kā par 30 %.
Ķīmisko vielu interference testā (tikai sistēmām, kuru pamatā ir antivielu metodes)	Nevajadzētu būt vērojamai būtiskai (≥ 30 % no attiecīgā hormona pamatproducēšanās līmeņa) šķērsreaktivitātei ar jebkādiem šūnu producētajiem hormoniem [b] [c].

[a] *Piezīme.* Metodes mērījumu robežu pamatā ir 5. tabulā sniegtās hormonu pamatproducēšanās līmeņu vērtības, un tās balstās uz veiktspēju. Ja iespējams panākt augstāku hormonu pamatproducēšanās līmeni, robeža var būt augstāka.

[b] Dažas T un E2 antivielas var procentuāli augstākā līmenī krusteniski reaģēt attiecīgi ar androstendionu un estronu. Šādos gadījumos ietekmi uz 17β-HSD precīzi noteikt nav iespējams. Tomēr no datiem joprojām var gūt noderīgu informāciju par vispārīgo ietekmi uz estrogēna vai androgēna producēšanos. Šādos gadījumos dati jāizsaka kā androgēnu/estrogēnu atbildes reakcija, nevis kā E2 un T.

[c] To vidū ir holesterīns, pregnenolons, progresterons, 11-dezoksikortikosterons, kortikosterons, aldosterons, 17α-pregnenolons, 17α -progesterons, dezoksikortizols, kortizols, DHEA, androstendions un estrons.

Laboratorijas kvalifikācijas tests

33. Pirms testēt nezināmas ķīmiskas vielas, laboratorijai ar kvalifikācijas testu jāpierāda, ka tā spēj sasniegt un uzturēt attiecīgus sekmīgai testa izpildei nepieciešamus šūnu kultivēšanas un testēšanas apstākļus. Tā kā jebkura testa veikšana ir tieši saistīta ar laboratorijas personālu, kas testu veic, šīs procedūras daļēji jāatkārto, ja laboratorijas darbinieki mainās.

34. Kvalifikācijas testu veic ar tādiem pašiem nosacījumiem, kā norādīts 38.–40. punktā, šūnas septiņu koncentrāciju pieauguma secībā eksponējot spēcīgu, mērenu un vāju inducētāju un inhibētāju iedarbībai, kā arī negatīvās kontroles ķīmiskai vielai (sk. 2. tabulu). Konkrētāk, testējamo ķīmisko vielu vidū ir spēcīgais inducētājs forskolīns (*CAS* Nr. 66575-29-9); spēcīgais inhibētājs prohloráze (*CAS* Nr. 67747-09-5); mērenais inducētājs atrazīns (*CAS* Nr. 1912-24-9); mērenais inhibētājs aminoglutetimīds (*CAS* Nr. 125-84-8); vājais (E2 producēšanās) inducētājs un vājais (T producēšanās) inhibētājs bisfenols A (*CAS* Nr. 80-05-7); negatīvās kontroles

▼M5

ķīmiskā viela – cilvēka horioniskais gonadotropīns (*HCG*) (*CAS* Nr. 9002-61-3), kā redzams 2. tabulā. Katrai ķīmiskajai vielai ar atsevišķu plati izpilda testus saskaņā ar 6. tabulā sniegto formātu. Katrā kārtējā dienas izpildē, kurā izmanto standartvielas, jāiekļauj viena *QC* plate (4. tabula, 36.–37. punkts)

2. tabula

Standartvielas un ekspozīcijas koncentrācijas

Standartviela	Testējamās koncentrācijas [μM]
Prohlorāze	0 ([a]); 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolīns	0 ([a]); 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30
Atrazīns	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutetimīds	0 ([a]); 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenols 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]) Šķīdinātāja (DMSO) kontrole (0), 1 μl DMSO uz iedobi.

Laboratorijas kvalifikācijas testā H295R līnijas šūnas standartvielām būtu jāeksponē 24 iedobju platēs. Visas testējamo ķīmisko vielu devas izsaka μM. Devas jāievada ar DMSO buferšķīdumu tilpumkoncentrācijā 0,1 % uz iedobi. Katra testējamā koncentrācija būtu jāpārbauda trīs identiskās iedobēs (6. tabula). Katrai ķīmiskajai vielai izmanto atsevišķu plati. Katras dienas izpildē izmanto vienu *QC* plati.

35. Jāveic šūnu dzīvotspējas analīze un hormonu analīze, kā paredzēts 42. līdz 46. punktā. Robežvērtība (zemākās novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*)) un lēmums par kvalificēšanu jāatspoguļo pārskatā un jāsalīdzina ar 3. tabulas vērtībām. Datus uzskata par pieņemamiem, ja tie apmierina *LOEC* un lēmumu kvalificēšanu saskaņā ar 3. tabulu.

3. tabula

Robežvērtības (*LOEC*) un lēmumu kvalificēšana attiecībā uz standartvielām

	CAS Nr.	*LOEC* [μM]		Kā kvalificē lēmumu	
		T	E2	T	E2
Prohlorāze	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (Inhibēšanās)	+ (Inhibēšanās)
Forskolīns	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Inducēšanās)	+ (Inducēšanās)
Atrazīns	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Inducēšanās)	+ (Inducēšanās)
Aminoglutetimīds	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibēšanās)	+ (Inhibēšanās)

▼M5

	CAS Nr.	*LOEC* [μM]		Kā kvalificē lēmumu	
		T	E2	T	E2
Bisfenols A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibēšanās)	+ (Inducēšanās)
HCG	9002-61-3	n. p.	n. p.	Negatīvs	Negatīvs

([a]) +, pozitīvs
N. p.: nepiemēro, jo pēc eksponēšanas negatīvās kontroles koncentrācijām, kas nav citotoksiskas, nevajadzētu notikt nekādām izmaiņām.

Kvalitātes kontroles plate

36. Kvalitātes kontroles (*QC*) plati izmanto, lai verificētu H295R šūnu rādītājus parastajos kultivēšanas apstākļos un lai izveidotu vēsturisku datubāzi ar hormonu koncentrācijām šķīdinātāja kontrolē, pozitīvā kontrolē un negatīvā kontrolē, un laika gaitā arī citiem kvalitātes kontroles pasākumiem.

— H295R līnijas šūnu rezultāti būtu jānovērtē, katru jaunu *ATCC* partiju vai iepriekš sasaldētu šūnu izejmateriālu pēc tam, kad tas izmantots pirmo reizi, pārbaudot ar *QC* plati, ja vien ar attiecīgo šūnu partiju nav izpildīts laboratorijas kvalifikācijas tests (32.–34. punkts).

— Ķīmisko vielu testēšanā ar kvalitātes kontroles plates palīdzību pilnīgi novērtē testa apstākļus (piem., šūnu dzīvotspēju, šķīdinātāja kontroles, negatīvās un pozitīvās kontroles un mainību šajā testā un salīdzinājumā ar citiem testiem), un kvalitātes kontroles platei jābūt katrā testa izpildē.

37. Kvalitātes kontroles testu veic 24 iedobju platē, ievērojot tās pašas inkubācijas, devu ievadīšanas, šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes, hormonu ekstrakcijas un hormonu analīzes procedūras, kā aprakstīts 38.–46. punktā attiecībā uz ķīmisko vielu testēšanu. Uz *QC* plates ir tukši paraugi, šķīdinātāja kontroles un – divās koncentrācijās – kāds zināms E2 un T sintēzes inducētājs (forskolīns, 1, 10 μM) un zināms inhibētājs (prohlorāze, 0,1, 1 μM). Turklāt dažās iedobēs par dzīvotspējas/citotoksicitātes testa pozitīvo kontroli izmanto MeOH. Plates izkārtojuma detalizēts apraksts sniegts 4. tabulā. Kritēriji, kas jāapmierina attiecībā uz kvalitātes kontroles plati, norādīti 5. tabulā. Gan šķīdinātāja kontroliedobē, gan tukšā parauga iedobēs hormoniem T un E2 jāproducējas minimālā pamatapjomā.

4. tabula

Neeksponētu H295R šūnu un zināmiem inhibētājiem (PRO = prohlorāze) un stimulētājiem (FOR = forskolīns) eksponētu šūnu E2 un T producēšanās rādītāju kvalitātes kontroles plates izkārtojums. Pēc ekspozīcijas beigām un barotnes izņemšanas visās MeOH iedobēs pievienos 70 % metanola šķīdumu, to izmantojot par citotoksicitātes pozitīvo kontroli (sk. citotoksicitātes testu validācijas pārskata (4) III papildinājumā).

	1	2	3	4	5	6
A	Tukšs ([a])	Tukšs ([a])	Tukšs ([a])	Tukšs ([a]) (+ MeOH) ([b])	Tukšs ([a]) (+ MeOH) ([b])	Tukšs ([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]) Tukšā parauga iedobēs pie šūnām lej tikai barotni (t. i., bez šķīdinātāja).
([b]) Metanolu (MeOH) pievieno **pēc** tam, kad pabeigta eksponēšana un barotne izņemta no attiecīgajām iedobēm.
([c]) Šķīdinātāja (DMSO) kontrole (1 μl uz iedobi).

5. tabula

Veiktspējas kritēriji attiecībā uz kvalitātes kontroles plati

	T	E2
Hormona pamatproducēšanās šķīdinātāja kontroliedobē (*SC*)	≥ 5 reiz *LOQ*	≥ 2,5 reiz *LOQ*
Inducēšanās (10 μM forskolīna)	≥ 1,5 reiz *SC*	≥ 7,5 reiz *SC*
Inhibēšanās (1 μM prohlorāzes)	≤ 0,5 reiz *SC*	≤ 0,5 reiz *SC*

Eksponēšana ķīmiskajai vielai: procedūra

38. Priekšinkubētās šūnas izņem no inkubatora (21. punkts) un pārbauda zem mikroskopa, lai pirms devu ievadīšanas pārliecinātos, ka tās ir piemērotā stāvoklī (adhēzija, morfoloģija).

39. Šūnas ievieto biodrošā skapī, papildināto barotni izņem un aizstāj ar jaunu papildināto barotni (1 ml uz iedobi). Šajā testēšanas metodē par šķīdinātāju ieteicams izmantot DMSO. Ja kādu apsvērumu dēļ izvēlas citu šķīdinātāju, tas zinātniski jāpamato. Šūnas testējamai ķīmiskai vielai eksponē, uz 1 ml papildinātās barotnes (iedobes tilpumu) pievienojot 1 μl attiecīgās vielas koncentrācijas dimetilsulfoksīdā (sk. validācijas pārskata (4) II papildinājumu). Šādi iedobēs iegūst galīgo DMSO šķīduma koncentrāciju 0,1 %. Lai paraugi būtu adekvāti samaisīti, parasti ieteicams attiecīgo testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju dimetilsulfoksīdā samaisīt ar papildināto barotni tā, lai iegūtu katras devas vēlamo galīgo koncentrāciju, un šo maisījumu iedobē ievietot tūlīt pēc līdzšinējās barotnes izņemšanas. Izmantojot šo risinājumu, visās iedobēs jānodrošina nemainīga DMSO šķīduma koncentrācija (0,1 %). Iedobēs, kurās ir divas augstākās koncentrācijas, ar stereomikroskopu vizuāli novērtē, vai neveidojas nogulsnes vai duļķes, kas liecina, ka testējamā viela nav pilnīgi izšķīdināma. Minētajos apstākļos (duļķes, nogulšņu veidošanās) pārbauda arī iedobes ar nākamajām zemākajām koncentrācijām u. tjpr., un šķīdumā pilnīgi neizšķīdušās koncentrācijas no tālākas izvērtēšanas un analīzes izslēdz. Plati uz 48 stundām novieto atpakaļ inkubatorā 37 °C temperatūrā pie CO_2 koncentrācijas gaisā 5 %. Testējamo ķīmisko vielu plates izkārtojums sniegts 6. tabulā. "1.–7. koncentrācija" apzīmē testējamās ķīmiskās vielas izvietojumu devu pieauguma secībā.

▼M5

6. tabula

Devu ievadīšanas shēma H295R šūnu eksponēšanai testējamām ķīmiskajām vielām 24 iedobju platē.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4. koncentrācija	4. koncentrācija	4. koncentrācija
B	1. koncentrācija	1. koncentrācija	1. koncentrācija	5. koncentrācija	5. koncentrācija	5. koncentrācija
C	2. koncentrācija	2. koncentrācija	2. koncentrācija	6. koncentrācija	6. koncentrācija	6. koncentrācija
D	3. koncentrācija	3. koncentrācija	3. koncentrācija	7. koncentrācija	7. koncentrācija	7. koncentrācija

40. Pēc 48 stundām ekspozīcijas plates no inkubatora izņem un zem mikroskopa katrā iedobē pārbauda šūnu stāvokli (adhēziju, morfoloģiju, konfluenci) un citotoksicitātes pazīmes. Katras iedobes barotni sadala divos vienādos daudzumos (katrā apmēram 490 µl) un ievieto divās atsevišķās attiecīgi marķētās kivetēs (t. i., viena alikvota, kas katrai iedobei ir rezerves paraugs). Lai šūnas neizžūtu, barotni izņem pa vienai rindai vai šķērsrindai un aizstāj ar šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes testa barotni. Ja šūnu dzīvotspēja/citotoksicitāte netiek mērīta tūlīt, katrā iedobē pievieno 200 µl *PBS* ar Ca^{2+} un Mg^{2+}. Līdz tālākai apstrādei, kurā analizē hormonu koncentrācijas (sk. 44.–46. punktu), šīs barotnes sasaldē – 80 °C temperatūrā. Lai gan – 80 °C temperatūrā glabātā barotnē T un E2 parasti vismaz trīs mēnešus ir stabili, katrā laboratorijā būtu jādokumentē hormonu stabilitāte glabāšanas laikā.

41. Tūlīt pēc barotnes izņemšanas katrā eksponētajā platē nosaka šūnu dzīvotspēju/citotoksicitāti.

Šūnu dzīvotspējas noteikšana

42. Lai noteiktu, kā testējamā ķīmiskā viela, iespējams, ietekmē šūnu dzīvotspēju, var izmantot pašizraudzītu šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes testu. Testam jābūt tādam, lai ar to varētu iegūt iedobes dzīvotspējīgo šūnu procenta patiesu mērījumu, vai arī ir jāpierāda, ka tests ir tieši salīdzināms ar *Live/Dead*® testu (sk. validācijas pārskata (4) III papildinājumu) (proti, ar *Live/Dead*® testa lineāru funkciju). Alternatīvs tests, kura līdzvērtīga darbība ir pierādīta, ir *MTT* [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijbromīda] tests (18). Šūnu dzīvotspējas novērtēšana ar iepriekš minētajām metodēm ir relatīvs mērījums, kurā nav noteikti redzamas lineāras sakarības ar šūnu absolūto skaitu iedobē. Tāpēc analizētājam katra iedobe paralēli būtu subjektīvi jānovērtē vizuāli un digitāli jānofotografē iedobes ar *SC* un divām augstākajām koncentrācijām, kuras nav citotoksiskas, un attēli jānoglabā arhīvā, lai pēc tam nepieciešamības gadījumā varētu novērtēt faktisko šūnu blīvumu. Ja iedobes vizuāla apskate vai dzīvotspējas/citotoksicitātes tests liecina, ka šūnu skaits varētu būt palielinājies, konstatējums par šādu palielinājumu jāverificē. Ja verifikācija apstiprina šūnu skaita pieaugumu, tas jānorāda testēšanas pārskatā. Šūnu dzīvotspēju izsaka attiecībā pret vidējo atbildes reakciju šķīduma kontroliedobēs, kurās šūnu dzīvotspēju uzskata par 100 %, un to aprēķina atbilstoši izmantotajam šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes testam. *MTT* testā var izmantot šādu formulu:

▼M5

dzīvotspējīgo šūnu % = (atbildes reakcija iedobē – vidējā atbildes reakcija ar MeOH apstrādātās [= 100 % šūnu mirušas] iedobēs) ÷ (vidējā *SC* iedobju reakcija – vidējā reakcija ar MeOH apstrādātās [= 100 % šūnu mirušas] iedobēs).

43. Galīgajā datu analīzē nedrīkstētu iekļaut iedobes, kurās dzīvotspēja salīdzinājumā ar *SC* iedobju vidējo dzīvotspēju (= 100 % dzīvotspēja) ir zemāka par 80 %. Steroīdģenēzes inhibēšanās, kas notiek pie gandrīz 20 % citotoksicitātes, būtu rūpīgi jāizvērtē, lai nodrošinātu, ka inhibēšanās cēlonis nav citotoksicitāte.

Hormonu analīze

44. Hormonu līmeņa mērīšanas sistēmas T un E2 analīzei laboratorijas var izvēlēties. Lai pagatavotu šķīdumus ar standartlīknes lineārajai daļai atbilstošu koncentrāciju, var izmantot katras apstrādātās grupas barotņu liekās alikvotas. Kā norādīts 29. punktā, lai laboratorijas pierādītu savas hormonu noteikšanas sistēmas (piem., *ELISA*, *RIA*, *LC-MS*, *LC-MS/MS*) atbilstību *QC* kritērijiem, pirms *QC* izpildēm vai ķīmisko vielu testēšanas tajās jāizanalizē papildināta barotne, kurai pievienota iekšēja hormona kontroldeva. Lai nodrošinātu, ka ar hormonu līmeņa mērīšanu neinterferē testa sistēmas sastāvdaļas, pirms mērīt līmeni, hormonus var būt nepieciešams ekstrahēt no barotnes (ekstrahēšanas nepieciešamības nosacījumus sk. 30. punktā). Ekstrahēšanu ieteicams veikt saskaņā ar validācijas pārskata (4) III papildinājuma procedūrām.

45. Ja hormonu producēšanās mērīšanai izmanto tirdzniecībā pieejamu testa komplektu, hormonu analīze jāveic tā, kā specificēts testa komplekta ražotāja rokasgrāmatās. Lielākajai daļai ražotāju ir sava unikāla hormonu analīzes metode. Paraugu atšķaidījums jānoregulē tā, lai šķīdinātāja kontroliedobēm paredzētās hormonu koncentrācijas atrastos konkrētā testa standartlīknes lineārā diapazona centrā (validācijas pārskata (4) III papildinājums). Vērtības ārpus standartlīknes lineārās daļas jāatmet.

46. Galīgās hormonu koncentrācijas aprēķina šādi:

Piemērs:

Ekstrahēti:	450 µl barotnes
Rekonstituēšana notikusi:	250 mikrolitros testa buferšķīduma
Testā izmantotais atšķaidījums:	1:10 (lai nodrošinātu, ka paraugs atrodas standartlīknes lineārajā diapazonā)
Testā izmantotā hormonu koncentrācija	150 pg/ml (daudzums jau koriģēts attiecībā uz koncentrāciju testējamā parauga mililitrā)
Atgūstamība:	89 %
Galīgā hormonu koncentrācija =	(Hormonu koncentrācija (uz ml) ÷ atgūtais daudzums) (atšķaidījuma koeficients)
Galīgā hormonu koncentrācija =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Testējamo koncentrāciju izvēle

47. Testam vajadzīgas vismaz divas neatkarīgas izpildes. Ja vien testējamās koncentrācijas neizraugās, balstoties uz iepriekšēju informāciju, piemēram, šķīdības robežām vai citotoksicitāti, pirmajā izpildē testējamām koncentrācijām vajadzētu būt ar intervāliem $\log_{10}$ un maksimālajai koncentrācijai – 10^{-3} M. Ja ķīmiskā viela ir šķīstoša un nevienā no testētajām koncentrācijām nav novērota tās citotoksicitāte, un ja pirmajā izpildē ar visām koncentrācijām rezultāts bijis negatīvs, tas jāapstiprina ar vēl vienu izpildi, kuras nosacījumi ir tādi paši kā pirmajai (7. tabula). Ja pirmās izpildes rezultāti ir *neviennozīmīgi* (proti, kārtās izteikta izmaiņa no *SC* rezultātiem statistiski būtiski atšķiras tikai vienā koncentrācijā) vai pozitīvi (proti, ar divām vai vairāk blakus esošām koncentrācijām ir novērojama statistiski būtiska kārtās izteikta izmaiņa), tests jāatkārto atbilstoši 7. tabulas norādījumiem, precizējot izraudzītās testējamās koncentrācijas. Otrajā un trešajā atkārtojumā (ja tādus veic) testējamās koncentrācijas būtu jākoriģē, balstoties uz rezultātiem, kas pirmajā testēšanas reizē gūti, orientējoties uz koncentrācijām, pie kurām novērojama ietekme, un izmantojot koncentrāciju atstatumu 1/2-log (piem., ja pirmajā izpildē ar vērtībām 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1 000 μM bija novērojama inducēšanās pie 1 un 10 μM, nākamajā izpildē jātestē koncentrācijas 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μM), ja vien nav jāizmanto zemākas koncentrācijas, lai tiktu sasniegta *LOEC*. Pēdējā gadījumā otrajā izpildē, izmantojot 1/2 log skalu, jātestē koncentrācija, kas ir vismaz piecas koncentrācijas pakāpes zemāka nekā pirmajā izpildē testētā zemākā koncentrācija. Ja otrā izpilde pirmās izpildes rezultātus neapstiprina (proti, koncentrāciju, ar kuru iepriekšējā reizē rezultāts bijis pozitīvs, testējot pieauguma soļa ± 1 robežās, statistiski būtiski rezultāti netiek gūti), jāveic trešais eksperiments, izmantojot sākotnējos testēšanas nosacījumus. Neviennozīmīgus pirmās izpildes rezultātus par negatīviem uzskata tad, ja divas vēlākās izpildes novēroto ietekmi neapstiprina. Neviennozīmīgus rezultātus par pozitīvu atbildes reakciju (ietekmi) uzskata tad, ja reakciju apstiprina vismaz vēl viena izpilde koncentrācijas pieauguma soļa ± 1 robežās (sk. datu interpretācijas procedūru 55. punktā).

7. tabula

Lemšanas matrice iespējamiem iznākuma scenārijiem

1. izpilde	2. izpilde		3. izpilde		Lēmums	
Scenārijs	Lēmums	Scenārijs	Lēmums	Scenārijs	Pozitīvs	Negatīvs
Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Negatīvs	Apstāties			X
Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Pozitīvs	Precizēt ([b])	Negatīvs		X
Neviennozīmīg ([c])	Precizēt ([b])	Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Negatīvs		X
Neviennozīmīgs ([c])	Precizēt ([b])	Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Pozitīvs	X	
Neviennozīmīgs ([c])	Precizēt ([b])	Pozitīvs			X	
Pozitīvs	Precizēt ([b])	Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Pozitīva	X	

▼M5

1. izpilde	2. izpilde		3. izpilde		Lēmums	
Scenārijs	Lēmums	Scenārijs	Lēmums	Scenārijs	Pozitīvs	Negatīvs
Negatīvs	Apstiprināt ([a])	Pozitīva	Precizēt ([b])	Pozitīvs	X	
Pozitīvs	Precizēt ([b])	Pozitīvs	Apstāties		X	

([a]) Izmantojot to pašu eksperimenta plānu, apstiprināt iepriekšējo izpildi.
([b]) Atkārtot testu ar koncentrāciju atstatumu 1/2-log (orientējoties uz koncentrāciju, ar kuru iepriekšējā eksperimentā gūti būtiski atšķirīgi rezultāti).
([c]) Kārtās izteiktas izmaiņas vienā koncentrācijā statistiski būtiski atšķiras no *SC*.

Testa plates kvalitātes kontrole

48. Papildus *QC* plates kritēriju apmierināšanai būtu jāapmierina citi kvalitātes kritēriji, kas saistīti ar to, kāda variācija ir pieņemama attiecībā uz replicētajām iedobēm, replicētajiem eksperimentiem, hormonu līmeņa mērīšanas sistēmu linearitāti un jutību, hormonu līmeņa replicēto mērījumu mainību vienam un tam pašam paraugam un pievienoto zināmo hormonu devu procentuālo atgūstamību pēc barotnes ekstrakcijas (attiecīgā gadījumā; attiecībā uz ekstrakcijas prasībām sk. 30. punktu); minētie kritēriji ir sniegti 8. tabulā. Lai datus varētu ņemt vērā turpmākā izvērtēšanā, tiem jāatrodas katram parametram definētā pieņemamības diapazonā. Ja šie kritēriji nav apmierināti, izklājlapā jānorāda, ka attiecībā uz konkrēto paraugu *QC* kritēriji nav apmierināti, un paraugs jāanalizē atkārtoti vai no datu kopuma jāatmet.

8. tabula

H295R testa plates parametru pieņemamības diapazoni un/vai variācija (%)

(*LOQ* – hormonu līmeņa mērīšanas sistēmas kvantitatīvās noteikšanas robeža; *CV* – variācijas koeficients; *SC* – šķīdinātāja kontroliedobe; *DPM* – sabrukumu skaits minūtē)

	Salīdzinājums	T	E2
Hormonu pamatproducēšanās *SC*	Par cik kārtām pārsniegta *LOQ*	≥ pieckārt	≥ divarpus kārtas
Ekspozīcijas eksperimenti: *SC CV* vienā platē (replicētas iedobes)	Absolūtās koncentrācijas	≤ 30 %	≤ 30 %
Ekspozīcijas eksperimenti: *SC CV* vairākās platēs (replicēti eksperimenti)	Izmaiņas kārtu izteiksmē	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonu līmeņa mērīšanas sistēma –jutība	Konstatējamā samazināšanās kārtu izteiksmē attiecībā pret *SC*	≥ pieckārt	≥ divarpus kārtas
Hormonu līmeņa mērīšanas sistēma – *SC* replicēto mērījumu *CV* ([a])	Absolūtās koncentrācijas	≤ 25 %	≤ 25 %
Barotnes ekstrakcija – iekšējās 3H standartvielas atgūstamība (attiecīgā gadījumā)	DPM	≥ 65 % nominmāls	

([a]) Attiecas uz viena un tā paša parauga replicētiem mērījumiem.

▼M5

DATU ANALĪZE UN ATSPOGUĻOŠANA TESTĒŠANAS PĀRSKATĀ

Datu analīze

49. Lai ķīmiski mainītā hormonu producēšanā izvērtētu relatīvo pieaugumu/samazinājumu, rezultāti būtu jānormalizē līdz katras testa plates vidējai *SC* vērtībai un jāizsaka kā izmaiņas attiecībā pret katras testa plates *SC*. Visus datus izsaka kā vidējo vērtību ± 1 standartnovirze (*SD*).

50. Datu analīzē iekļauj tikai datus par hormoniem no iedobēm, kurās citotoksicitāte bijusi mazāka par 20 %. Relatīvās izmaiņas aprēķina šādi:

Relatīvā izmaiņa = (hormonu koncentrācija katrā iedobē) ÷ (vidējā hormonu koncentrācija visās kontroliedobēs, kurās ir tikai šķīdinātājs).

51. Ja iedobes vizuāla apskate vai 42. punktā aprakstītais dzīvotspējas/citotoksicitātes tests liecina, ka šūnu skaits varētu būt palielinājies, šķietamais palielinājums jāverificē. Ja verifikācija apstiprina šūnu skaita pieaugumu, tas jānorāda testēšanas pārskatā.

52. Pirms statistisku analīžu veikšanas jāizvērtē pieņēmumi par normalitāti un dispersijas homogenitāti. Normalitāte jāvērtē, izmantojot varbūtību sadalījuma standartgrafikus vai citu attiecīgu statistisku metodi (piem., Šapiro–Vilka testu). Ja datu sadalījums (kārtās izteiktas izmaiņas) nav normālsadalījums, jāmēģina datus transformēt tā, lai tuvinātos normālsadalījumam. Ja datu sadalījums ir normālsadalījums vai tuvu tam, ķīmisko vielu koncentrāciju grupu un *SC* atšķirības būtu jāanalizē, izmantojot parametrisku testu (piem., Daneta (*Dunnett*) testu), kurā neatkarīgais mainīgais ir *koncentrācija*, bet atkarīgais – *atbildes reakcija* (izmaiņa kārtu izteiksmē). Ja dati nav sadalīti normāli, jāizmanto attiecīgs neparametrisks tests (piem., Kruskala–Vollisa (*Kruskal-Wallis*) tests vai Stīla (*Steel*) rangu tests "daudzi pret vienu"). Atšķirības uzskata par būtiskām, ja $p \leq 0,05$. Statistiskos izvērtējumos balstās uz katras iedobes vidējām vērtībām, kas atvasinātas no neatkarīgiem replicētiem datu punktiem. Tā kā pirmajā izpildē starp devām ir lieli atstatumi ($\log_{10}$ skala), paredzams, ka daudzos gadījumos divas lielākās devas atradīsies sigmoidālās līknes lineārajā daļā un skaidru sakarību starp koncentrāciju un atbildes reakciju aprakstīt nebūs iespējams. Tāpēc pirmajai izpildei vai jebkādiem citiem datu kopumiem, kur stāvoklis ir tāds pats (piemēram, maksimālo iedarbīgumu nav iespējams skaitliski novērtēt), izmanto I tipa statistiku ar nemainīgu mainīgo, kā aprakstīts iepriekš.

53. Ja uz līknes lineārās daļas atrodas vairāk nekā divi datu punkti un ja maksimālo iedarbību aprēķināt ir iespējams, kā tas sagaidāms dažās no otrajām izpildēm, kuras veiktas, izmantojot ekspozīcijas koncentrācijas ar atstatumu puse log, iedarbīgās koncentrācijas (piem., *EC*50 un *EC*20) būtu jāaprēķina ar probita vai logita analīzi vai ar jebkādu citu piemērotu regresijas modeli.

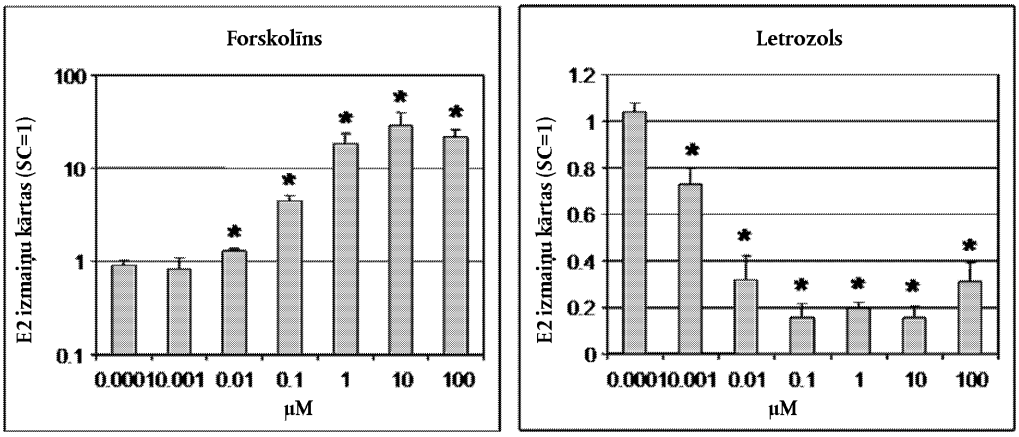
54. Rezultāti jāsniedz gan grafiski (joslu diagrammā, kas attēlo vidējo vērtību ± 1 *SD*), gan tabulā (*LOEC*/*NOEC*, iedarbības virziens un maksimālās atbildes reakcijas stiprums – datu daļa, kas attiecas uz devu un atbildes reakciju) (piemēru sk. 3. attēlā). Datu novērtējumu uzskata par derīgu tikai tad, ja to pamatā bijušas vismaz divas neatkarīgas izpildes. Eksperimentu vai izpildi par neatkarīgu uzskata tad, ja tie veikti atšķirīgā dienā ar jaunu šķīdumu un kontrolmateriālu komplektu. Otrajā un trešajā atkārtojumā (ja tādi nepieciešami) izmantotās koncentrācijas var pielāgot, pamatojoties uz pirmās reizes rezultātiem, lai labāk definētu devas un atbildes reakcijas diapazonu, kurā atrodas *LOEC* (sk. 47. punktu).

▼M5

3. attēls

Piemērs. H295R testā iegūto datu izklāsts un izvērtējums grafika un tabulas formā

(Ar zvaigznītēm apzīmētas no šķīdinātāja kontroliedobes rezultātiem statistiski būtiskas atšķirības ($p < 0,05$). *LOEC* – zemākās novērojamās ietekmes koncentrācija; maksimālā izmaiņa – jebkurā koncentrācijā novērotas maksimālās atbildes reakcijas stiprums attiecībā pret vidējo *SC* atbildes reakciju (= 1))



Ķīmiskā viela	LOEC	Maksimālā izmaiņa
Forskolīns	0,01	0,15 reizes
Letrozols	0,001	29 reizes

Datu interpretācijas procedūra

55. Uzskata, ka testējamā viela ir pozitīva, ja vismaz divās neatkarīgās izpildēs ar divām blakus esošām koncentrācijām kārtu indukcija statistiski atšķiras ($p \leq 0,05$) no šķīdinātāja kontroliedobes rezultāta (sk. 7. tabulu). Uzskata, ka testējamā ķīmiskā viela ir negatīva, ja ir bijušas divas neatkarīgas negatīvas izpildes vai ja bijušas trīs izpildes, no kurām divas bijušas negatīvas, bet viena – neviennozīmīga vai pozitīva. Ja trīs neatkarīgos eksperimentos gūtie dati 7. tabulā sniegtos lemšanas kritērijus neapmierina, eksperimentu rezultātus interpretēt nav iespējams. Rezultātu interpretācijā nedrīkstētu ņemt vērā rezultātus, kas gūti ar koncentrācijām, kuras pārsniedz šķīdības robežas, vai ar citotoksiskām koncentrācijām.

Testēšanas pārskats

56. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai:

Testēšanas komplekss:

— kompleksa nosaukums un adrese,

— pētījuma vadītājs, pārējais personāls un tā pienākumi pētījumā,

— pētījuma sākuma un beigu datums.

▼**M5**

Testējamā ķīmiskā viela, reaģenti un kontroles materiāli:

— testējamās ķīmiskās vielas, reaģentu un kontroles materiālu identitāte (attiecīgi nosaukums/*CAS* Nr.), avots, sērijas/partijas numurs, tīrība, piegādātājs un raksturojums,

— testējamās ķīmiskās vielas fizikālais raksturojums un attiecīgās fizikāl-ķīmiskās īpašības,

— kādi ir glabāšanas apstākļi un ar kādu metodi un cik bieži sagatavotas testējamās ķīmiskās vielas, reaģenti un kontrolmateriāli,

— testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte.

Šūnas:

— šūnu avots un šūnu veids,

— testā izmantoto šūnu pasāžu skaits (šūnu pasāžu identifikators),

— šūnu kultūru uzturēšanas procedūru apraksts.

Pirmstestēšanas prasības (attiecīgā gadījumā):

— ķīmisko vielu interferences testēšana hormonu testā: apraksts un rezultāti,

— hormonu ekstrakcijas efektivitātes mērījumu apraksts un rezultāti,

— visu veicamo analītisko testu standarti un kalibrācijas līknes,

— izraudzīto analītisko testu noteikšanas robežas.

Testa apstākļi:

— barotņu sastāvs,

— testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija,

— šūnu blīvums (skaitliski novērtētā vai izmērītā šūnu koncentrācija 24 un 48 stundu periodā),

— testējamās ķīmiskās vielas šķīdība (šķīdības robeža, ja tā noteikta),

— inkubācijas laiks un nosacījumi.

Testa rezultāti:

— neapstrādātie dati par katru iedobi attiecībā uz kontrolēm un testējamām ķīmiskām vielām – visi replicētie mērījumi hormonu producēšanās līmeņa mērīšanas instrumenta oriģināldatu formā (piem., *OD*, fluorescences vienības, *DPM* u. tml.),

— normalitātes validācija vai paskaidrojums par datu transformāciju,

— vidējās atbildes reakcijas ± 1 *SD* uz katru mērīto iedobi,

— citotoksicitātes dati (testējamās koncentrācijas, kas radījušas citotoksicitāti),

— *QC* prasību izpildes apstiprinājums,

▼**M5**

— attiecībā uz citotoksicitāti koriģēta relatīvā izmaiņa salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontrolplati,

— joslu diagramma, kurā redzamas relatīvās izmaiņas (izmaiņas kārtu izteiksmē) pie katras koncentrācijas, *SD* un statistiskais nozīmīgums, kā norādīts 49.–54. punktā.

Datu interpretācija:

— piemērojiet rezultātiem datu interpretācijas procedūru un komentējiet konstatējumus.

Komentāri:

— vai pētījums kaut kādā mērā vedina domāt, ka T/E2 datus varētu ietekmēt netieša ietekme uz glikokortikoīdu un minerālkortikoīdu ceļiem?

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, šā pielikuma B.54. daļas 2. papildinājums

(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. Toxic. 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. Pieejams: [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. Pieejams: [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, pieejams: [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. Toxic. 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. Ind. 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) Šā pielikuma B.55. nodaļa: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.

(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

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Konfluence ir šūnām atļautais pārklājums uz kultūras barotnes virsmas vai savairošanās visā barotnes tilpumā.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

CV ir variācijas koeficients, ko definē kā sadalījuma standartnovirzes attiecību pret tā vidējo aritmētisko.

CYP ir citohroma P450 monooksigenāzes, proti, enzīmi, kas katalizē daudzveidīgas bioķīmiskās reakcijas (arī steroīdhormonu sintēzi un metabolismu), un šos enzīmus producējošu gēnu saime.

DPM ir sabrukumu skaits minūtē. Tas ir vienā minūtē konstatētais attiecīgajā radioaktīva materiāla daudzumā sabrukušo atomu skaits.

E2 ir 17β estradiols – pats nozīmīgākais zīdītājdzīvnieku hormonālās sistēmas estrogēns.

H295R šūnas ir cilvēka virsnieru karcinomas šūnas, kam piemīt tādas pašas fizioloģiskās īpašības kā zonāli nediferencētām cilvēka augļa virsnieru dziedzera šūnām un kas ekspresē visus steroīdģenēzes ceļa enzīmus. Tās ir pieejamas no *ATCC*.

Sasaldēšanas barotne ir barotne, ko izmanto šūnu sasaldēšanai un sasaldētu šūnu uzglabāšanai. Tā sastāv no barotnes izejmateriāla, kam pievienots *BD NuSerum* un dimetilsulfoksīds.

Lineārais diapazons ir hormonu līmeņa mērīšanas sistēmas standartlīknes diapazons, kurā rezultāti ir proporcionāli paraugā esošā analīta koncentrācijai.

LOQ ir "*kvantitatīvās noteikšanas robeža*" jeb mazākais ķīmiskas vielas daudzums, ko iespējams norādītās ticamības robežās atšķirt no minētās ķīmiskās vielas neesības (tukšas vērtības). Ja nav specificēts citādi, *LOQ* šīs metodes vajadzībām parasti definē testēšanas sistēmu ražotājs.

LOEC ir zemākās novērojamās ietekmes koncentrācija jeb zemākais koncentrācijas līmenis, kurā testā gūtā atbildes reakcija statistiski atšķiras no šķīdinātāja kontroliedobē gūtās atbildes reakcijas.

NOEC ir nenovērojamās ietekmes koncentrācija jeb, ja testā nav bijis pozitīvas atbildes reakcijas, augstākā testētā koncentrācija.

Pasāža ir to reižu skaits, kad šūnas pēc jaunas kultūras ieaudzēšanas no sasaldēta izejmateriāla tikušas sadalītas. No sasaldētā izejmateriāla ieaudzēto sākotnējo pasāžu apzīmē ar pirmo numuru (1). Vienu reizi sadalītas šūnas apzīmē kā 2. pasāžu, utt.

PBS ir R. Dulbeko (*Dulbecco*) izstrādātais fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums.

Kvalitātes kontrole (saīsinājumā *QC*) ir derīgu datu garantēšanai nepieciešamie pasākumi.

Kvalitātes kontroles plate ir 24 iedobju plate, kurā ir divu koncentrāciju pozitīvās un negatīvās kontroles paraugi un ar kuras palīdzību iespējams uzraudzīt jaunas šūnu partijas rezultātus vai nodrošināt pozitīvo kontroli ķīmisko vielu testā.

Izpilde ir neatkarīgs eksperiments ar jaunu šķīdumu un kontrolmateriālu komplektu.

▼**M5**

Barotnes izejmateriāls ir pamats citu reaģentu pagatavošanai. Tas sastāv no R. Dulbeko modificētās Īgla (*Eagle*) barotnes un Hama (*Ham's*) uzturvielu maisījuma F12 (*DMEM*/F12), kas attiecībā 1:1 izšķīdināti 15 mM *HEPES* buferšķīdumā bez fenolsarkanā vai nātrija bikarbonāta. Nātrija bikarbonātu pievieno par bufervielu, sk. validācijas pārskata (4) II papildinājumu.

Papildinātā barotne sastāv no barotnes izejmateriāla, kam pievienots *BD NuSerum* un *ITS*+ augstākās kvalitātes maisījums, sk. validācijas pārskata (4) II papildinājumu.

Steroīdģenēze ir sintēzes ceļš, kurā no holesterīna tiek iegūti dažādi steroīdhormoni. Steroīdhormonu sintēzes ceļā ir vairāki starpprodukti, piemēram, progesterons un testosterons, kas paši par sevi ir nozīmīgi hormoni, taču tie ir arī sintēzes ceļa tālākajos posmos rodošos hormonu prekursori.

T ir testosterons, viens no diviem nozīmīgākajiem zīdītājdzīvnieku hormonālās sistēmas androgēniem.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Testēšanas plate ir plate, kurā H295R šūnas eksponē testējamām ķīmiskām vielām. Testēšanas plates satur šķīdinātāja kontroliedobes un testējamo ķīmisko vielu septiņās koncentrācijās pa trim identiskiem paraugiem.

Tripsīns 1X ir atšķaidīts šķīdums, kas satur enzīmu tripsīnu, aizkuņģa dziedzera serīnproteāzi, ko izmanto šūnu atdalīšanai no kultivēšanas plates, sk. validācijas pārskata (4) III papildinājumu.

▼M5

B.58. **TRANSGĒNU GRAUZĒJU SOMATISKO ŠŪNU UN DZIMUMŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU TESTI**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 488 (2013. gads). Ir pieejamas ES testēšanas metodes, ko izmantot plašam klāstam *in vitro* mutāciju testu, ar kuriem var noteikt hromosomu un/vai gēnu mutācijas. Ir tādas testēšanas metodes, kurās beigupunktus (t. i., hromosomu aberācijas un neplānotu DNS sintēzi) testē *in vivo*, tomēr ar šīm metodēm nenosaka gēnu mutāciju daudzumu. Transgēnu grauzēju (*TGR*) mutāciju testi apmierina vajadzību pēc praktiskiem un plaši pieejamiem gēnu mutāciju *in vivo* testiem.

2. *TGR* mutāciju testi ir plaši recenzēti (24) (33). Tajos izmanto transgēnas peles un žurkas, kuru genomā ir hromosomāli integrētas vairākas plazmīdu vai fāgu atspoles vektoru kopijas. Transgēniem ir ziņotājgēni, pēc kuriem iespējams noteikt dažādu veidu mutācijas, kas *in vivo* inducētas ar testējamām ķīmiskām vielām.

3. Grauzēju mutāciju skaitu novērtē, atgūstot transgēnu un analizējot ziņotājgēna fenotipu saimniekbaktērijā, kurai šā ziņotājgēna nav. *TGR* gēnu mutāciju testos skaita mutācijas, kas inducētas ģenētiski neitrālos gēnos, kuri var būt atgūti no burtiski jebkuriem grauzēja audiem. Tāpēc šie testi apiet daudzus ar *in vivo* gēnu mutāciju pētīšanu endogēnos gēnos saistītus ierobežojumus (piem., analīzei piemērotie audi, pret mutācijām vērsta negatīvā/pozitīvā izlase).

4. Nozīmīgi pierādījumi liecina, ka transgēni uz mutagēniem reaģē līdzīgi endogēnajiem gēniem, jo īpaši attiecībā uz to, kā konstatē bāzes pāru maiņas, mutācijas ar lasīšanas nobīdi un mazas delēcijas un insercijas (24).

5. Starptautiskajos genotoksicitātes testēšanas semināros (*IWGT*) ir izteikts atbalsts tam, ka gēnu mutāciju *in vivo* noteikšanā izmanto *TGR* gēnu mutāciju testu, un ir ieteikts protokols tā īstenošanai (15) (29). Minētie ieteikumi ir šīs testēšanas metodes pamatā. Plašāka analīze, kas pamato šā protokola izmantošanu, atrodama (16).

6. Gaidāms, ka *TGR* gēnu mutācijas testu turpmāk varēs kombinēt ar atkārtotas devas toksicitātes pētījumu (šā pielikuma B.7. nodaļa). Tomēr nepieciešami tādi dati, lai būtu drošība, ka *TGR* gēnu mutāciju testu jutību neietekmē tas, ka atkārtotas devas toksicitātes pētījumos periods starp devu ievadīšanas perioda beigām un paraugu ņemšanas laiku ir īsāks – viena diena (*TGR* gēnu mutāciju testos – trīs dienas). Nepieciešami arī tādi dati, lai būtu drošība, ka atkārtotas devas testa veikšanu negatīvi neietekmē tas, ka ir izraudzīti nevis parastas līnijas grauzēji, bet gan transgēni grauzēji. Kad minētie dati būs pieejami, šī testēšanas metode tiks atjaunināta.

7. Galveno terminu definīcijas sniegtas papildinājumā.

▼M5

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

8. Pietiekami daudz datu, lai būtu pamatoti tos izmantot šajā testēšanas metodē, ir pieejams par šādiem standartapstākļos veiktiem *TGR* gēnu mutāciju testiem: *lacZ* bakteriofāga peles (*Muta™Mouse*); *lacZ* plazmīdas peles; *gpt delta* (*gpt* un *Spi*⁻) peles un žurkas; *lacI* peles un žurkas (*Big Blue*®). Turklāt modeļu *Big Blue*® un *Muta™Mouse* mutāciju izvērtēšanai var izmantot *cII* pozitīvās izlases testu. *TGR* modeļu mutaģenēzi parasti novērtē kā mutantu biežumu; tomēr nepieciešamības gadījumā papildu informāciju var iegūt mutāciju molekulārā analīzē (sk. 24. punktu).

9. Šie grauzēju gēnu mutāciju *in vivo* testi ir īpaši piemēroti mutagēnisku apdraudējumu novērtēšanai, jo testos gūtā atbildes reakcija ir atkarīga no *in vivo* metabolisma, farmakokinētikas, DNS labošanas procesiem un DNS sintēzes uz bojātas matrices, lai gan minētie dažādām sugām, audu un DNS bojājuma veidiem var būt dažādi. Gēnu mutāciju *in vivo* tests noder, lai turpinātu pētīt *in vitro* sistēmā konstatētu mutagēnisku iedarbību un lai darbu ar testu rezultātiem turpinātu, izmantojot citus *in vivo* beigupunktus (24). Gēnu mutācija ne vien ir cēloniski saistīta ar vēža rašanos, bet ir arī būtisks beigupunkts, ar kura palīdzību iespējams prognozēt mutāciju radītas somatisko audu slimības, kas nav vēzis (12) (13), un pa dzimumšūnas līniju nodotas slimības.

10. Ja ir liecības par to, ka testējamā ķīmiskā viela vai attiecīgs metabolīts interesējošos audos nenonāks, *TGR* gēnu mutācijas testu veikt nav lietderīgi.

TESTA PRINCIPS

11. 8. punktā aprakstītajos testos mērķgēns sākotnēji ir baktērijas vai bakteriofāga gēns, ko no grauzēju genomiskās DNS atgūst, transgēnu ievietojot λ bakteriofāga vai plazmīdas atspoles vektorā. Procedūra ir tāda, ka genomisko DNS ekstrahē no interesējošiem grauzēja audiem, to *in vitro* apstrādā (t. i., lai atgūtu atspoles vektoru, iesaiņo λ vektorus vai liģē un elektroporē plazmīdas) un pēc tam piemērotos apstākļos nosaka mutācijas saimniekbaktērijās. Testos tiek izmantoti neitrāli transgēni, kas lielākajā daļā audu veidu ir viegli atgūstami.

12. *TGR* gēnu mutāciju pamatekspermentā grauzējam ilgāku laiku dod ķīmisku vielu. Ķīmiskās vielas var ievadīt jebkādā piemērotā ceļā, arī implantēt (piem., medicīnisko ierīču testēšanā). Kopējo periodu, kurā dzīvnieks saņem devas, sauc par devu ievadīšanas periodu. Devu ievadīšanas periodam parasti seko tāds pirmsnonāvēšanas periods, kurā ķīmiskā viela netiek dota un neizlabojušies DNS bojājumi nostiprinās par stabilām mutācijām. Literatūrā šis periods pamīšus dēvēts par izpaušanās laiku, nostiprināšanās laiku vai ekspresijas laiku; šā perioda beigas ir paraugu ņemšanas laiks (15) (29). Kad dzīvnieks nonāvēts, no interesējošiem audiem izolē genomisko DNS un attīra.

▼M5

13. No vairākiem iesaiņojumiem/ligācijām iegūtos datus par atsevišķiem katra dzīvnieka audiem apvieno un parasti izvērtē mutantu biežumu, izmantojot 10^5 līdz 10^7 plakus veidojošo vienību vai kolonijas veidojošo vienību kopskaitu. Ja izmanto pozitīvās izlases (selektīvas) metodes, plakus veidojošo vienību kopskaitu neselektīvi nosaka ar atsevišķu plašu komplektu, kurā izlasi nepiemēro.

14. Ir izstrādātas pozitīvās izlases metodes, kas palīdz noteikt mutācijas gan *gpt* gēnā [*gpt* delta pelēm un žurkām, *gpt*⁻ fenotipam (20) (22) (28)], gan *lacZ* gēnā[pelēm *Muta™Mouse* vai *lacZ* plazmīdu pelēm (3) (10) (11) (30)]; savukārt līnijas *Big Blue*® dzīvniekiem *lacI* gēna mutācijas nosaka ar neselektīvu metodi, kurā mutanti tiek noteikti pēc krāsainu (zilu) plaku rašanās. Pozitīvās izlases metodes izmanto arī, lai konstatētu punktmutācijas, kas rodas λ bakteriofāga atspoles vektora *cII* gēnā [līnijas *Big Blue*® pelēm vai žurkām un līnijas *Muta™ Mouse* pelēm (17)], un delēcijas mutācijas, kas rodas λ *red* un *gam* gēnos [*Spi*⁻ izlase *gpt* delta pelēm un žurkām (21) (22) (28)]. Mutantu biežumu aprēķina, to plaku/plazmīdu skaitu, kam transgēnā ir mutācija, dalot ar to plaku/plazmīdu kopējo skaitu, kas atgūts no tā paša DNS parauga. *TGR* gēnu mutāciju pētījumos pārskatā ietvertais parametrs ir mutantu biežums. Turklāt var noteikt mutāciju biežumu kā to šūnu daļu, kurās ir neatkarīgas mutācijas; šis aprēķins jākoriģē ar klonālo ekspansiju, atgūtos mutantus sekvencējot (24).

15. *lacI, lacZ, cII* un *gpt* gēnu punktmutāciju testos saskaitītās mutācijas galvenokārt ir bāzu pāru maiņas, mutācijas ar nolasīšanas nobīdi un mazas insercijas vai delēcijas. Šo mutāciju veidu relatīvais īpatsvars spontāno mutāciju vidū ir līdzīgs tam, kāds sastopams endogēnajam *Hprt* gēnam. Lielas delēcijas var konstatēt tikai ar *Spi*⁻ izlases un *lacZ* plazmīdu testiem (24). Interesējošās mutācijas ir žurku vai peļu organismā radušās *in vivo* mutācijas. *In vivo* un *ex vivo* mutācijas fāgu/plazmīdu atgūšanas, replicēšanas vai labošanas ceļā rodas samērā reti, un dažās sistēmās tās var īpaši identificēt vai izslēgt, izmantojot saimniekbaktērijas/pozitīvās izlases sistēmu.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās testam

Dzīvnieku sugas izvēle

16. Patlaban ir pieejami daudzveidīgi transgēnu peļu modeļi gēnu mutāciju noteikšanai, un šīs sistēmas izmanto plašāk nekā transgēnu žurku modeļus. Ja žurka nepārprotami ir labāks modelis nekā pele (piemēram, gadījumos, kur tikai žurkām sastopama audzēja kancerogēniskā mehānisma pētīšanā tiek nodrošināta korelācija ar žurku toksicitātes pētījumu vai kur ir zināms, ka žurkas metabolisms ir līdzīgāks cilvēka metabolismam), jāapsver, vai neizmantot transgēnas žurkas modeli.

Turēšanas un barošanas apstākļi

17. Temperatūrai testa dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk par 70 %, jācenšas nodrošināt relatīvo mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā. Barošanai var izmantot parasto laboratorijas

▼M5

barību ar neierobežotu dzeramā ūdens piegādi. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šādu metodi. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, dzīvnieki būtu jātur nelielās (ne vairāk par pieciem) viendzimuma grupās. Ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi.

Dzīvnieku sagatavošana

18. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus, kas sasnieguši dzimumbriedumu (devu došanas sākumā 8–12 nedēļas vecus) nejaušināti iedala kontroles grupās un grupās, kas saņem devas. Katram dzīvniekam atsevišķi piešķir identifikāciju. Dzīvniekus laboratorijas apstākļiem aklimatizē vismaz piecas dienas. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo iedarbību. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

Devu sagatavošana

19. Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas ķīmiskās vielas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējvielās vai jāpievieno uzturam vai dzeramajam ūdenim. Šķidras testējamās ķīmiskās vielas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām dzīvniekus var pakļaut tās inhalatīvai iedarbībai gāzes, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosola veidā. Ja vien dati par testējamo ķīmisko vielu preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

Testēšanas apstākļi

Šķīdinātājs/nesējviela

20. Lietotajās devās šķīdinātājs vai nesējviela nedrīkst iedarboties toksiski un tā nedrīkst būt reaģētspējīga ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējvielas, jābūt datiem par to saderību. Kad vien iespējams, pirmām kārtām jāapsver, vai neizmantot šķīdinātājus vai nesējvielas uz ūdens bāzes.

Pozitīvās kontroles paraugi

21. Parasti vienlaikus jāizmanto pozitīvās kontroles dzīvnieki. Tomēr tādas laboratorijas, kas ir pierādījušas kompetenci (sk. 23. punktu) un šos testus izmanto ikdienā, katrā metodes sekmīguma apstiprināšanas pētījumā var iekļaut tādu dzīvnieku DNS, kam iepriekš dotas pozitīvās kontroles devas. Šāda DNS no iepriekšējiem eksperimentiem jāiegūst no tās pašas sugas un interesējošiem audiem un pienācīgi jāuzglabā (sk. 36. punktu). Ja vienlaikus tiek izmantotas pozitīvās kontroles devas, tās nav nepieciešams ievadīt pa to pašu ceļu kā testējamās ķīmiskās vielas; tomēr par pozitīvās kontroles vielām būtu jāzina, ka tās izraisa mutācijas viena vai vairāku veidu mērķaudos, kas attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu ir interesējošie audi. Pozitīvās kontroles ķīmisko vielu devas būtu jāizvēlas tā, lai radītu vāju vai vidēju iedarbību, kas objektīvi atbilst testa veiktspējai un jutībai. Pozitīvās kontroles ķīmisko vielu un dažu to mērķaudu piemēri sniegti 1. tabulā.

▼M5

1. tabula

Pozitīvās kontroles ķīmisko vielu un dažu to mērķaudu piemēri

Pozitīvās kontroles ķīmiskā viela, tās *CAS* Nr.	*Einecs* nosaukums un *Einecs* numurs	Parametri	Mutācijas mērķaudi	
			Žurkām	Pelēm
N-etil-N-nitrozourīnviela [*CAS* Nr. 759-73-9]	N-etil-N-nitrozourīnviela [212-072-2]	Mutagēns ar tiešu iedarbību	Aknas, plaušas	Kaulu smadzenes, taisnā zarna, taisnās zarnas epitēlijs, zarnas, aknas, plaušas, liesa, niere, olnīcu granulozās šūnas, vīrišķās dzimumšūnas
Etilkarbamāts (uretāns) [*CAS* Nr. 51-79-6]	Uretāns [200-123-1]	Mutagēns, nepieciešama vielmaiņas vide, rada tikai vāju ietekmi		Kaulu smadzenes, priekškuņģis, tievā zarna, aknas, plaušas, liesa
2,4-diaminotoluols (*CAS* Nr. 95-80-7)	4-metil-m-fenilēndiamīns [202-453-1]	Mutagēns, nepieciešama vielmaiņas vide, pozitīvs arī *Spi*⁻ testā	Aknas	Aknas
Benzo[a]pirēns (*CAS* Nr. 50-32-8)	Benzo[def]krizēns [200-028-5]	Mutagēns, nepieciešama vielmaiņas vide	Aknas, *omenta*	Kaulu smadzenes, krūtis, taisnā zarna, priekškuņģis, kuņģa dziedzerdaļa, sirds, aknas, plaušas, vīrišķās dzimumšūnas

Negatīvās kontroles paraugi

22. Katrā paraugu ņemšanas reizē jāparedz negatīvās kontroles paraugi, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesējvielu, bet pārējās darbības veic tāpat kā ar grupām, kam dotas devas. Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroldatu, kas liecinātu, ka izraudzītajam šķīdinātājam/nesējvielai nav slēptas kaitīgas vai mutagēnas iedarbības, katrā paraugu ņemšanas reizē jānodrošina arī kontroles bez devas, lai varētu konstatēt, cik pieņemami ir nesējvielu izmantot par kontrolvielu.

Laboratorijas kvalifikācijas verificēšana

23. Kompetence šo testu veikšanā būtu jākonstatē, pierādot spēju panākt rezultātus, kādi gaidāmi saskaņā ar publicētiem datiem (24), attiecībā uz: 1) mutantu biežumu, kas vērojams ar pozitīvās kontroles ķīmiskām vielām (vērā ņemot arī vāju atbildes reakciju), piemēram, 1. tabulā norādītām ķīmiskām vielām, ar vielām, kas nav mutagēnas, un ar nesējvielām, kas izmantotas par kontrolvielām; un 2) transgēnu atgūšanu no genomiskās DNS (piem., iesaiņošanas efektivitāti).

Mutantu sekvencēšana

24. Regulatīviem mērķiem, jo īpaši gadījumos, kur tiek iegūts nepārprotami pozitīvs vai negatīvs rezultāts, mutantu DNS sekvencēšana netiek prasīta. Tomēr sekvencēšanas dati var būt noderīgi, ja indivīdu vidū ir novērojama augsta variācija. Šajos gadījumos sekvencēšanu var izmantot tam, lai konkrētos audos identificētu unikālo mutāciju īpatsvaru, tādējādi izslēdzot iespēju, ka ir radušies "mutāciju laimesti" vai klonēšanas incidenti. Lai vienkārši noteiktu, vai mutantu biežumu veido arī klonālie mutanti, pietiek, ja katram dzīvniekam katra veida audiem sekvencē apmēram 10 mutantus; lai mutantu biežumu attiecībā uz klonalitāti matemātiski koriģētu, var būt nepieciešams sekvencēt pat 25 mutantus. Arī konstatējot gadījumus, kur mutāciju biežums nedaudz palielinājies (piem., tikai nedaudz pārsniedzot

▼M5

vērtības, kas gūtas ar kontrolparaugiem, kuriem devas nav dotas), var apsvērt, vai mutantus nevajadzētu sekvencēt. Mutagēnu ietekmi var veicināt arī mutāciju spektru atšķirības, kas pastāv starp devas saņēmušo un devas nesaņēmušo dzīvnieku mutantu kolonijām (29). Mutāciju spektri var noderēt arī mehānistisku hipotēžu izstrādē. Lai panāktu izmantotajam statistiskajam modelim atbilstošu statistisko jaudu (sk. 43. punktu), pētījumi, kuru protokolā ietilpst sekvencēšana, ir jāplāno īpaši rūpīgi, it sevišķi attiecībā uz sekvencēto mutantu skaitu vienā paraugā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

25. Grupā būtu iepriekš jānosaka tādai statistiskai jaudai pietiekams dzīvnieku skaits, lai varētu konstatēt, ka mutantu biežums ir vismaz dubultojies. Grupā būs vismaz pieci dzīvnieki, tomēr, ja statistiskā jauda nav pietiekama, dzīvnieku skaits attiecīgi jāpalielina. Parasti izmanto tēviņus. Var būt gadījumi, kur ir pamatoti testēt tikai mātītes; piemēram, ja testē sievietēm paredzētas zāles vai ja pēta sievietēm raksturīgu metabolismu. Ja toksicitātes vai metabolisma ziņā starp dzimumiem ir būtiskas atšķirības, ir nepieciešami gan tēviņi, gan mātītes.

Devu ievadīšanas periods

26. Pamatojoties uz novērojumiem par to, ka katrā devu došanas reizē mutācijas akumulējas, ir nepieciešams atkārtotu devu režīms: devu došana katru dienu 28 dienu periodā. Kopumā uzskata, ka šajā periodā pietiekami uzkrājas vāju mutagēnu izraisītās mutācijas un ekspozīcija notiek pietiekami ilgi, lai mutācijas varētu konstatēt orgānos, kuros šūnas vairojas lēni. Dažiem izvērtējumiem var būt lietderīgi izmantot alternatīvus devu došanas režīmus, un šādi alternatīvi devu došanas grafiki zinātniski jāpamato protokolā. Devu došana nedrīkst būt īsāka par laiku, kāds nepieciešams, lai pilnībā inducētos visi būtiskie metabolizējošie enzīmi, un īsākā devu došanas laikā var būt nepieciešams izmantot vairākus paraugu ņemšanas laikus, kas piemēroti orgāniem, kuros šūnas vairojas ar atšķirīgu ātrumu. Jebkurā gadījumā protokols jāpamato ar visu pieejamo informāciju (piemēram, par vispārīgo toksicitāti vai metabolismu un farmakokinētiku), jo īpaši tad, ja tajā atkāpjas no iepriekš minētajiem standartieteikumiem. Lai gan devu došanas periods, kas ilgāks par 8 nedēļām, var paaugstināt jutību, tas nepārprotami jāpaskaidro un jāpamato, jo ilgā devu došanas periodā mutantu biežums var šķietami paaugstināties klonālās ekspansijas dēļ (29).

Devu līmeņi

27. Devu līmeņu noteikšanā būtu jāpamatojas uz tam pašam ekspozīcijas ceļam veiktu devu diapazona noteikšanas pētījumu, kurā noteikta vispārīgā toksicitāte, vai uz līdzšinējo subakūtās toksicitātes pētījumu rezultātiem. Devu diapazonu noteikšanai var izmantot tās pašas grauzēju līnijas netransgēnus dzīvniekus. Lai galvenajā testā iegūtu pilnvērtīgu informāciju par devu un atbildes reakciju, pētījumā jābūt negatīvās kontroles grupai (sk. 22. punktu) un vismaz trim devu līmeņiem ar piemērotiem atstatumiem, izņemot gadījumus, kur ir izmantota robeždeva (sk. 28. punktu). Augstākajai devai jābūt

▼M5

maksimālajai panesamajai devai (*MTD*). Par *MTD* nosaka devu, no kuras izraisītajām toksicitātes pazīmēm būtu sagaidāms, ka tādā pašā devu režīmā augstākas devas būs letālas. Šo devu noteikšanas kritēriju izņēmumi var būt ķīmiskās vielas, kurām zemā netoksiskā devā ir specifiska bioloģiska iedarbība (piemēram, hormoni un mitogēni), un ķīmiskas vielas, kurām vērojamas piesātinātas toksikokinētiskās īpašības un kuras tādēļ katrā gadījumā jāizvērtē atsevišķi. Izmantotajām devām jābūt diapazonā no maksimālas toksicitātes līdz maztoksiskām vai netoksiskām devām.

Pieļaujamības tests

28. Ja devu diapazona noteikšanas eksperimenti vai jau esoši dati par radniecīgām grauzēju līnijām liecina, ka režīmā ar vismaz robeždevas apmēra devām (sk. turpmāk) vērā ņemama toksiskā ietekme netiek novērota, un ja dati par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām neliek gaidīt genotoksicitāti, var uzskatīt, ka pilnīgs pētījums ar trim devu līmeņiem nav nepieciešams. 28 dienas ilgā devu ievadīšanas periodā (t. i., devu dod reizi dienā 28 dienas) robeždeva ir 1 000 mg uz kilogramu ķermeņa svara dienā. 14 dienu ilgos vai īsākos devu ievadīšanas periodos robeždeva ir 2 000 mg uz kilogramu ķermeņa svara dienā (ja devu došanas grafiks nav 28 dienas reizi dienā, tas zinātniski jāpamato protokolā; sk. 26. punktu).

Devu ievadīšana

29. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada ar mākslīgo barošanu, izmantojot kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Parasti testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Tāpēc pieņemami var būt arī citi ekspozīcijas ceļi (piemēram, uzņemšana ar dzeramo ūdeni, ievadīšana zemādas audos, intravenoza ievadīšana, aplicēšana uz ādas, inhalācija, uzņemšana intratraheāli, ar uzturu vai implantācijas ceļā), ja to iespējams pamatot. Nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav fizioloģiski raksturīgs. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt mākslīgā barošanā vai ar injekciju, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Ja izmanto lielāku tilpumu, tas jāpamato. Izņemot kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir iespējami jāsamazina testā lietotā tilpuma mainība, koriģējot koncentrāciju tā, lai ar visiem devu līmeņiem tilpums būtu vienāds.

Paraugu ņemšanas laiks

Somatiskās šūnas

30. Paraugu ņemšanas laiks ir izšķirīgi svarīgs mainīgais, jo tas ir atkarīgs no perioda, kāds nepieciešams, lai mutācijas fiksētos. Atšķirīgiem audiem šis periods atšķiras, un ir konstatēta saistība ar šūnu populācijas nomaiņas laiku, piemēram, kaulu smadzenes un zarnas reaģē ātri, bet aknas – daudz lēnāk. Mutantu biežuma mērīšanā piemērots kompromiss gan audiem, kuros šūnas vairojas strauji, gan lēni, ir 28 secīgas devu došanas reizes katru dienu (kā norādīts 26. punktā) un paraugu ņemšana trīs dienas pēc pēdējās devu došanas reizes. Tomēr minētajos apstākļos audiem, kuru šūnas vairojas lēni, maksimālais mutantu biežums var neizpausties. Ja īpaši svarīga nozīme ir audiem, kuru šūnas vairojas lēni, lietderīgāks paraugu ņemšanas laiks varētu būt 28 dienas pēc 28 dienu ilgā devu ievadīšanas perioda (16) (29). Šis vēlākais paraugu ņemšanas laiks minētajos gadījumos aizstātu paraugu ņemšanu pēc trim dienām, un tas zinātniski jāpamato.

▼**M5**

Dzimumšūnas

31. *TGR* testi ir labi piemēroti pētījumam par gēnu mutāciju inducēšanu vīrišķās dzimumšūnās (7) (8) (27), attiecībā uz kurām ir labi zināms spermatoģenēzes laiks un kinētika (27). Tā kā pat pēc superovulācijas analīzei ir pieejams maz olšūnu un tā kā olšūnās DNS sintēze nenotiek, mutāciju noteikšanai sievišķās dzimumšūnās transgēnu testi nav izmantojami (31).

32. Vīrišķo dzimumšūnu paraugu ņemšanas laiki būtu jāizraugās tā, lai eksponētā veida šūnu paraugi tiktu ņemti visā dzimumšūnas attīstības ciklā un lai pietiekami eksponētas būtu šūnas tajā attīstības posmā, uz kuru ir mērķēta paraugu ņemšana. Laiks, kurā dzimumšūnas no spermatogonijiem, respektīvi, cilmes šūnām, pakāpeniski attīstās par nobriedušu spermu, kas nokļūst *vas deferens*/*cauda epididymis*, ir apmēram 49 dienas pelēm (36) un 70 dienas žurkām (34) (35). Pēc 28 dienu ekspozīcijas ar tam sekojošu paraugu ņemšanas periodu pēc trim dienām no *vas deferens*/*cauda epididymis* savāktā sperma ((7) (8)) pārstāv tādu šūnu populāciju, kas eksponēta apmēram spermatoģenēzes perioda otrajā pusē, kurā ietilpst mejozes periods un pēcmejozes periods, bet ne spermatogoniju vai cilmes šūnu periods. Lai no *vas deferens*/*cauda epididymis* paraugam pietiekami ievāktu tādas šūnas, kas ekspozīcijas periodā bijušas spermatozoīdu cilmes šūnas, pēc devu došanas perioda beigām ir nepieciešams noteikt papildu paraugu ņemšanas laiku, minimāli 7 nedēļas (pelēm) vai 10 nedēļas (žurkām).

33. To šūnu vidū, kas pēc 28 + 3 dienu režīma izspiestas no sēklas kanāliņiem, ir jaukta veida šūnas – bagātīgs dzimumšūnu klāsts, kurā pārstāvēti visi attīstības periodi (7) (8). Gēnu mutāciju noteikšanai paredzētus paraugus ņemot no šīm šūnām, dzimumšūnu mutāciju inducēšanās posmus nevar novērtēt tik precīzi, kā spermatozoīdus ņemot no *vas deferens*/*cauda epididymis* (jo no sēklas kanāliņiem var ņemt vairāku veidu dzimumšūnas, un šo šūnu populāciju kontaminēs arī kādas somatiskas šūnas). Tomēr, papildus no *vas deferens*/*cauda epididymis* ņemtajiem spermatozoīdiem ņemot šūnu paraugus no sēklas kanāliņiem ar tikai 28 + 3 dienu paraugu ņemšanas režīmu, dažas no iegūtajām šūnām būtu tikušas eksponētas lielākajā daļā dzimumšūnu attīstības fāzu un varētu noderēt dažu dzimumšūnu mutagēnu konstatēšanā.

Novērojumi

34. Vismaz reizi dienā ir jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi, vēlams, vienādos laikos katru dienu, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc vielas došanas. Dzīvnieku veselības stāvoklis ir jāprotokolē. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz saslimstību un mirstību. Visi dzīvnieki vismaz reizi nedēļā un nonāvēšanas dienā jānosver. Barības patēriņa mērījumi jāizdara vismaz ik nedēļu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš būtu jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvnieki, kam ar neletālām pazīmēm izpaužas pārlieka toksicitāte, pirms testa perioda beigām būtu jāeitanazē (23).

▼M5

Audu ievākšana

35. Audu ievākšana ir skaidri jāpamato. Tā kā mutāciju inducēšanos ir iespējams pētīt faktiski jebkuros audos, ievācamie audi būtu jāizraugās, pamatojoties uz to, kāpēc par pētāmo ķīmisko vielu tiek veikts pētījums, un uz jebkādiem esošiem datiem par tās mutagenitāti, kancerogenitāti vai toksicitāti. Svarīgi vērā ņemami faktori ir arī ievadīšanas ceļš (kura pamatā ir varbūtīgais cilvēka ekspozīcijas ceļš vai ceļi), prognozētais sadalījums audos un iespējamais darbības mehānisms. Ja nav nekādas pamatinformācijas, var ievākt vairākus iespējami interesējošus somatiskos audus. Pārstāvētiem vajadzētu būt audiem, kas atjaunojas ātri, audiem, kas atjaunojas lēni, un saskares vietas audiem. Turklāt gadījumam, ja turpmāk būs nepieciešams analizēt dzimumšūnu mutagenitāti, būtu jāievāc un jāuzglabā spermatozoīdi no *vas deferens*/*cauda epididymides* un dzimumšūnas no sēklas kanāliņiem (kā aprakstīts 32. un 33. punktā). Jānosaka orgānu svars, un – attiecībā uz lielākiem orgāniem – visiem dzīvniekiem audi jāņem no vienas un tās pašas orgāna zonas.

Audu un DNS glabāšana

36. Audi (vai audu homogenāti) jāglabā – 70 °C vai zemākā temperatūrā un DNS izolēšanai jāizmanto piecu gadu laikā. Līdz 4 °C atdzesētu piemērotā buferšķīdumā uzglabātu izolētu dezoksiribonukleīnskābi mutāciju analīzei optimāli būtu izmantot viena gada laikā.

Audu izvēle mutantu analīzei

37. Audu izvēlē jāpamatojas uz tādiem apsvērumiem kā: 1) ievadīšanas ceļš vai pirmās saskares ceļš (piem., orālā ievadīšanā tā ir kuņģa dziedzerdaļa, inhalatīvā ceļā – plauša, vai aplicēšanas ceļā – āda); 2) vispārīgos toksicitātes pētījumos novērotie farmakokinētiskie parametri, kas liecina par vielas sadalījumu, aizturēšanu vai uzkrāšanos audos vai par toksicitātes mērķorgāniem. Ja pētījumi tiek veikti kā kancerogenitātes pētījumu turpinājums, būtu jāņem vērā, kādi ir kancerogenitātes mērķaudi. Analizējamos audus izraugās tā, lai maksimāli būtu iespējams noteikt tādas ķīmiskas vielas, kuras ir tiešas iedarbības *in vitro* mutagēni, ātri metabolizējas, ir augsti reaģētspējīgas vai slikti absorbējamas, vai tādas ķīmiskas vielas, kuru mērķaudi ir atkarīgi no to ievadīšanas ceļa (6).

38. Ja pamatinformācijas nav, tad, ņemot vērā arī saskares vietu attiecīgajā ievadīšanas ceļā, ir jānovērtē mutagenitāte aknās un vismaz vienos audos, kuros ātri notiek dalīšanās (piem., kuņģa dziedzerdaļa, kaulu smadzenes). Lielākajā daļā gadījumu augstāk minētās prasības var apmierināt, analizējot divu veidu rūpīgi izraudzītus audus, dažos gadījumos var būt nepieciešami trīs un vairāk veidu audi. Ja ir pamats īpašām bažām par ietekmi uz dzimumšūnām, arī par pozitīvu atbildes reakciju somatiskajās šūnās, jāizvērtē mutācijas dzimumšūnu audos.

Mērīšanas metodes

39. Ir pieejamas laboratoriskas standartmetodes vai ir publicētas metodes, ar kurām konstatēt mutantus, kas radušies ieteicamajos transgēnu modeļos: *lacZ* lambda bakteriofāgs un plazmīdas (30); *lacI* peles (2) (18); *gpt* delta peles (22); *gpt* delta žurkas (28); *cII* (17). Modifikācijas ir jāpamato un pienācīgi jādokumentē. Lai panāktu pietiekamu plaku vai koloniju skaitu, var apkopot datus par vairākiem iesaiņojumiem. Tomēr, ja pienācīgu plaku skaitu var sasniegt tikai ar daudzām iesaiņošanas reakcijām, var būt, ka DNS nav kvalitatīva. Šādos gadījumos dati jāizmanto piesardzīgi, jo tie var būt mazticami. Optimālais plaku vai koloniju kopskaits uz vienu DNS

▼M5

paraugu ir atkarīgs no tā, cik statistiski varbūtīgi ir pie kāda noteikta mutantu spontānas parādīšanās biežuma konstatēt pietiekamu mutantu skaitu. Kopumā, ja mutantu spontānas parādīšanās biežums atrodas kārtā 3×10^{-5} (15), minimālais nepieciešamais plaku skaits ir no 125 000 līdz 300 000. *Big Blue® lacI* testā ir svarīgi, katrā uzsējumā iestrādājot attiecīgu krāsas kontroli, pierādīt, ka mutantus ir iespējams konstatēt visā krāsu fenotipu diapazonā. Audi un attiecīgie paraugi (vienumi) jāapstrādā un jāanalizē blokos, kā vienu grupu apstrādājot nesējvielas/šķīdinātāja kontroles grupu, pozitīvās kontroles grupu (ja tādu izmanto) vai pozitīvās kontroles DNS grupu (attiecīgā gadījumā) un katru atsevišķo devas saņēmušo grupu.

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Rezultātu apstrāde

40. Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulā. Eksperimenta vienība ir viens dzīvnieks. Pārskatā jānorāda plakus veidojošo vienību (PVV) vai kolonijas veidojošo vienību (KVV) kopskaits, mutantu skaits un mutantu biežums attiecībā uz ikvienu audu veidu katram dzīvniekam. Ja ir vērojamas vairākas iesaiņošanas/atgūšanas reakcijas, pārskatā jānorāda reakciju skaits uz vienu DNS paraugu. Lai gan dati jāsaglabā par katru atsevišķu reakciju, pārskatā norāda tikai galīgo PVV vai KVV skaitu. Pārskatā atspoguļo datus par toksicitāti un klīniskajām pazīmēm, kā minēts 34. punktā. Attiecībā uz katru analizēto mutantu jānorāda sekvencēšanas rezultāti un attiecībā uz katru dzīvnieku un katra veida audiem – iznākumā iegūtie mutāciju biežuma aprēķini.

Rezultātu statistisks izvērtējums un interpretācija

41. Ir vairāki pozitīva rezultāta noteikšanas kritēriji, piemēram, ar devu saistīta mutāciju biežuma paaugstināšanās vai nepārprotama mutāciju biežuma paaugstināšanās kādā atsevišķā devas grupā salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesējvielas kontroles grupu. Lai iegūtu datus, ar ko pietiek devas un atbildes reakcijas analizēšanai, jāanalizē vismaz trīs grupas, kas saņēmušas devas. Lai gan galvenajam apsvērumam vajadzētu būt rezultātu bioloģiskajam nozīmīgumam, par testēšanas rezultātu izvērtēšanas palīglīdzekli var izmantot attiecīgas statistiskas metodes (4) (14) (15) (25) (26). Izmantotajos statistiskajos testos par eksperimenta vienību jāuzskata dzīvnieks.

42. Ja ar testējamo ķīmisko vielu nevienos audos pēc iepriekš minētajiem kritērijiem nav gūti rezultāti, uzskata, ka šajā testā tās mutagenitāte nav konstatēta. Lai negatīvais rezultāts būtu bioloģiski nozīmīgs, jāapstiprina, ka audu ekspozīcija ir notikusi.

43. DNS sekvencēšanas analīzes rezultātu interpretēšanā var izmantot vairākas statistiskas pieejas (1) (5) (9) (19).

44. Apsverot, vai novērotās vērtības ir vēsturiskā kontroles diapazona robežās vai ārpus tām, var iegūt pieturas punktus atbildes reakcijas bioloģiskā nozīmīguma izvērtēšanai (32).

▼M5

Testēšanas pārskats

45. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai:

Testējamā ķīmiskā viela:

— identifikācijas dati un *CAS* Nr., ja zināms,

— avots, sērijas numurs, ja zināms,

— fizikālās īpašības un tīrības pakāpe,

— pētījuma veikšanā būtiskas fizikālķīmiskās īpašības,

— testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte, ja tā zināma.

Šķīdinātājs/nesējviela:

— nesējvielas izvēles pamatojums,

— testējamās vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējvielā, ja tā zināma,

— uztura, dzeramā ūdens vai inhalāciju preparātu sagatavošana,

— preparātu analītiska noteikšana (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas).

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija un izvēles pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u. c.,

— katra dzīvnieka svars testa sākumā, katrā grupā norādot ķermeņa svara diapazonu, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testēšanas apstākļi:

— pozitīvās un negatīvās (nesējviela/šķīdinātājs) kontroles dati,

— devu diapazona noteikšanas pētījuma dati,

— devu izvēles pamatojums,

— detalizēta informācija par testējamo ķīmisko preparātu,

— sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu,

— ievadīšanas ceļa izvēles pamatojums,

— metodes, ar kādām mēra testējamās vielas toksicitāti dzīvniekiem, ja tādas pieejamas, arī histopatoloģiskas vai hematoloģiskas analīzes un dzīvnieku novērošanas un svēršanas biežums,

— metodes, ar kurām verificē, ka testējamā ķīmiskā viela ir sasniegusi mērķaudus, vai, ja iegūtie rezultāti ir negatīvi, tās vispārējo apriti,

▼M5

— faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta no testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas (*ppm*) uzturā/dzeramajā ūdenī un no uzņemtā to daudzuma (attiecīgā gadījumā),

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apraksts par devu došanas un paraugu ņemšanas grafikiem un veiktās izvēles pamatojums,

— eitanāzijas paņēmiens,

— audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,

— metodes, ar kurām izolē grauzēju genomisko DNS, no genomiskās DNS izgūstot transgēnu un transgēno DNS nododot baktērijai, kas ir saimniekorganisms,

— visu šūnu, komplektu un reaģentu avots un sērijas numuri (attiecīgā gadījumā),

— mutantu uzskaitīšanas metodes,

— metodes, ar kurām izdara mutantu molekulāro analīzi un kuras izmanto koriģēšanai attiecībā uz klonalitāti un/vai mutāciju biežuma aprēķināšanai.

Rezultāti:

— dzīvnieka stāvoklis pirms testēšanas perioda un tā laikā, arī toksicitātes pazīmes,

— ķermeņa un orgānu svars nonāvēšanas brīdī,

— attiecībā uz katra veida audiem no katra dzīvnieka: mutantu skaits, plaku vai koloniju skaitliskais novērtējums, mutantu biežums,

— attiecībā uz katra veida audiem no katras dzīvnieku grupas: iesaiņošanas reakciju skaits uz vienu DNS paraugu, kopējais mutantu skaits, vidējais mutantu biežums, standartnovirze,

— ja iespējams, devas un atbildes reakcijas sakarība,

— attiecībā uz katra veida audiem no katra dzīvnieka, ja ir veikta mutāciju molekulārā analīze: neatkarīgo mutantu skaits un vidējais mutāciju biežums,

— pašreizējie un vēsturiskie negatīvas kontroles dati, norādot robežas, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— pašreizējie pozitīvas kontroles dati (vai nevienlaicīgas pozitīvās kontroles dati par DNS),

— analītiskās noteikšanas rezultāti, ja tie pieejami (piem., iesaiņošanā izmantotās DNS koncentrācijas, DNS sekvencēšanas dati),

— izmantotā statistiskā analīze un metodes.

Komentāri par rezultātiem

Secinājums

▼**M5**

LITERATŪRA

(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. 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. 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. 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°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, 391. – 410. lpp.

▼**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, 1071.–1148. lpp.

(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**

Papildinājums

Definīcijas

Devu ievadīšanas periods ir kopējais periods, kura laikā dzīvnieks saņem devas.

Bāzu pāru maiņa ir mutācija, kuras dēļ kādu DNS nukleotīdu bāzi aizstāj cita DNS nukleotīdu bāze.

Kapsīds ir vīrusdaļiņu ietverošais proteīna apvalks.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

Klonāla ekspansija ir daudzu šūnu rašanās no atsevišķas (mutējušas) šūnas.

Kolonijas veidojoša vienība jeb KVV ir dzīvotspējīgo baktēriju skaita mērvienība.

Konkatemērs ir gara nepārtraukta biomolekula, kas sastāv no vairākām virknē saistītām identiskām kopijām.

***Cos* saits** ir no 12 nukleotīdiem veidots vienķēdes DNS segments, kāds ir lambda bakteriofāga divķēžu genoma abos galos.

Delēcija ir mutācija, kurā genoms zaudē vienu vai vairākus (secīgus) nukleotīdus.

Elektroporācija ir šūnu membrānu caurlaidības palielināšana ar elektriskā lauka pulsāciju.

Endogēns gēns ir genomā jau sākotnēji bijis gēns.

Ekstrabinomiāla variācija ir atkārtotu populācijas daļas skaitlisko novērtējumu lielāka mainība, nekā būtu gaidāms, ja populācijai būtu binomiāls sadalījums.

Mutācija ar nolases nobīdi ir ģenētiska mutācija, ko rada ar trīs nedalāma nukleotīdu skaita insercijas vai delēcijas tādā DNS sekvencē, kura kodē proteīnu/peptīdu.

Insercija ir viena vai vairāku nukleotīdu bāzu pāru pievienošana DNS sekvencei.

Mutāciju laimests ir liels skaits mutantu, kas klonālā ekspansijā radies no vienas atsevišķas mutācijas.

Lielas delēcijas ir vairāk nekā dažu kilobāzu delēcijas DNS sekvencē (kuras droši konstatējamas ar *Spi*⁻ izlasi un *lacZ* plazmīdas testiem).

Ligēšana ir divu DNS molekulas galu kovalenta sasaistīšana, kurā izmanto DNS ligāzi.

Mitogēns ir ķīmiska viela, kas šūnu ierosina uz dalīšanos, iedarbinot mitozi (t. i. šūnas dalīšanos).

Neitrāls gēns ir gēns, ko neietekmē ne pozitīvs, ne negatīvs izlases spiediens.

Iesaiņošana ir infekciozu fāga daļiņu sintezēšana no fāga kapsīda un astes proteīnu preparāta un fāga DNS molekulu konkatemēra. Visbiežāk ar šādu paņēmienu infekciozās lambda daļiņās iesaiņo DNS, kura uzklonēta uz lambda vektora (ar *cos* saitiem atdalīta).

Iesaiņošanas efektivitāte ir tas, cik efektīvi saimniekbaktērijās atgūstami iesaiņotie bakteriofāgi.

▼M5

Plakus veidojoša vienība (jeb PVV) ir dzīvotspējīgo bakteriofāgu skaita mērvienība.

Punktmutācija ir vispārīgs termins mutācijai, kas skar tikai nelielu DNS sekvenci, arī mazām insercijām, delēcijām un bāzes pāru maiņām.

Pozitīvā izlase ir metode, kas dod iespēju izdzīvot tikai mutantiem.

Ziņotājgēns ir gēns, kuram ir viegli konstatējams mutējušā gēna produkts.

Paraugu ņemšanas laiks ir tāda pirmsnonāvēšanas perioda beigas, kurā ķīmiskā viela netiek dota un kura laikā neapstrādāti DNS bojājumi nostiprinās par stabilām mutācijām.

Atspoles vektors ir vektors, kas konstruēts tā, lai spētu vairoties divās atšķirīgās saimnieksugās; tāpēc atspoles vektorā insertētu DNS iespējams testēt vai manipulēt divu dažādu veidu šūnās vai divos dažādos organismos.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Transgēns ir tāds, kas nāk no tāda organisma vai saistīts ar tādu organismu vai pats ir tāds organisms, kura genoms ir mainīts, uz to pārnesot vienu vai vairākus citas sugas gēnus.

▼M7

B.59. *IN CHEMICO* ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: TIEŠAIS PEPTĪDREAĢĒTSPĒJAS TESTS (*DPRA*)

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 442C (2015). Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Šī testēšanas metode piedāvā *in chemico* procedūru (tiešo peptīdreaģētspējas testu [*Direct Peptide Reactivity Assay*], *DPRA*), kas izmantojama, lai saskaņā ar ANO *GHS* un *CLP* regulu nošķirtu ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem.

Pastāv vispārēja vienprātība par galvenajiem bioloģiskajiem notikumiem, kas ir ādas sensibilizācijas pamatā. Esošās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, *AOP*) (2) — no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei, proti, alerģiskam kontaktdermatītam cilvēkos vai kontakthipersensibilizācijai grauzējos. Ādas sensibilizācijas *AOP* kontekstā molekulārais iniciācijas notikums ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos.

Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana maksimizācijas testu jūrascūciņām (*Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test*, *GMPT*) un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6 (3)) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas indukcijas fāze, gan tās izpausmes fāze. Atzinīgi novērtēts ir arī tests ar pelēm, proti, limfmezglu lokālās stimulācijas tests (*Local Lymph Node Assay*, *LLNA*, TM B.42 (4)) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, *LLNA: DA* (TM B.50 (5)) un *LLNA:BrdU-ELISA* (TM B.51 (6)), kurās visās novērtē vienīgi indukcijas reakciju, jo visas šīs metodes dzīvnieku labturības un objektīva ādas sensibilizācijas indukcijas fāzes mērījuma ziņā ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām.

Pēdējā laikā mehānistiskās *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes tiek uzskatītas par zinātniski derīgām metodēm ķimikāliju radīto ādas sensibilizācijas apdraudējumu izvērtēšanai. Tomēr, lai būtu iespējams pilnīgi aizstāt pašreizējos testus ar dzīvniekiem, integrētās testēšanas un novērtēšanas pieejās (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, *IATA*) jākombinē vairākas metodes (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kurās dzīvniekus neizmanto, ņemot vērā, ka katrai pašreiz pieejamajai bezdzīvnieku metodei ir ierobežots mehānistiskais *AOP* tvērums (2) (7).

DPRA tiek piedāvāta, lai varētu pētīt ādas sensibilizācijas *AOP* molekulāro iniciācijas notikumu, proti, proteīnreaģētspēju, kvantitatīvi izsakot testējamo ķimikāliju spēju reaģēt uz sintētiskiem modeļpeptīdiem, kuri satur lizīnu vai cisteīnu (8). Pēc tam cisteīna un lizīna peptīdu procentuālā samazinājuma vērtības izmanto, lai vielu klasificētu kādā no četrām reaģētspējas klasēm, ar kurām nošķir ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem (9).

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼M7

DPRA ir izvērtēts validācijas pētījumā, ko vadīja Eiropas Savienības references laboratorija dzīvnieku testēšanai alternatīvu metožu jomā (*EURL ECVAM*), un vēlākā neatkarīgā profesionālvērtēšanā, ko veica *EURL ECVAM* zinātniskā padome (*ESAC*), un tika atzīts par zinātniski derīgu (10) izmantošanai *IATA* ietvaros un ādas sensibilizatoru un nesensibilizatoru nošķiršanai nolūkā klasificēt un marķēt apdraudējumus. Piemēri *DPRA* datu izmantošanai kombinācijā ar citu informāciju ir pieejami literatūrā (11) (12) (13) (14).

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI, PIEMĒROJAMĪBA UN IEROBEŽOJUMI

Ir labi zināma proteīnreaģētspējas korelācija ar ādas sensibilizācijas potenciālu (15) (16) (17). Tomēr, tā kā proteīna saistīšana atspoguļo tikai vienu būtisku notikumu (pat ja tas ir ādas sensibilizācijas *AOP* molekulārais iniciācijas notikums), ar informāciju par proteīnreaģētspēju, kas iegūta ar testēšanas metodēm un tādām metodēm, kas neietver testēšanu, var nepietikt, lai izdarītu secinājumu, ka ķimikālijai ādas sensibilizācijas potenciāls nepiemīt. Tādēļ ar šo testēšanas metodi iegūtie dati jāskata integrētas pieejas, piemēram, *IATA*, satvarā un jāapvieno ar citu papildinformāciju, piem., tādu, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi būtiski ādas sensibilizācijas *AOP* notikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analoģijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem.

Šo testēšanas metodi apvienojumā ar citu papildinformāciju var izmantot tam, lai saskaņā ar *IATA* būtu vieglāk ādas sensibilizatorus (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1. kategorija) nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Šo testēšanas metodi nevar izmantot vienu pašu ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai apakškategorijās 1.A un 1.B saskaņā ar ANO *GHS*/*CLP*, ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumiem. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvu rezultātu, kas iegūts ar *DPRA*, var vienu pašu izmantot ķimikālijas klasificēšanai ANO *GHS*/*CLP* 1. kategorijā.

Ir pierādīts, ka *DPRA* testēšanas metode ir pārnesama uz laboratorijām, kurām ir pieredze augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfijas (*HPLC*) analīzes veikšanā. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šīs testēšanas metodes, ir aptuveni 85 % tajā pašā laboratorijā un 80 % citās laboratorijās (10). Validācijas pētījumā (18) un publicētajos pētījumos (19) iegūtie rezultāti kopumā liecina, ka ādas sensibilizatoru (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem *DPRA* pareizība ir 80 % (N = 157), jutība — 80 % (88/109) un specifiskums — 77 % (37/48) salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem. Visticamāk, *DPRA* testā pārāk zemu tiks novērtētas tās ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1.B apakškategorija), nevis tās ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1.A apakškategorija) (18) (19). Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *DPRA* kā atsevišķu testēšanas metodi, ir tikai orientējošas, jo šī testēšanas metode jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar *IATA* un atbilstīgi 9. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, kā arī citi testi ar dzīvniekiem var nepilnīgi atspoguļot situāciju interesējošajā sugā, t. i., cilvēkos. Pamatojoties uz vispārējiem pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka *DPRA* var izmantot testējamām ķimikālijām, kas aptver dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakciju mehānismus, ādas sensibilizācijas potence (kā noteikts *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (8) (9) (10) (19). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka *DPRA* var palīdzēt identificēt ādas sensibilizācijas apdraudējumus.

▼M7

Terminu “testējamā ķimikālija” šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, un tas nav saistīts ar *DPRA* pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Šī testēšanas metode nav pielietojama metāla savienojumu testēšanā, jo, kā zināms, tie ar proteīniem reaģē ar citiem mehānismiem, nevis kovalentajām saitēm. Testējamai ķimikālijai jāšķīst piemērotā šķīdinātājā ar galīgo koncentrāciju 100 mM (sk. 18. punktu). Tomēr testējamās ķimikālijas, kuras pie šādas koncentrācijas nešķīst, drīkst testēt arī pie mazākām šķīdības koncentrācijām. Tādā gadījumā pozitīvu rezultātu joprojām varētu izmantot, lai pamatotu testa ķimikālijas atzīšanu par ādas sensibilizatoru, taču negatīva rezultāta gadījumā nedrīkstētu stingri secināt, ka tā nav reaģētspējīga. Patlaban ir pieejama ierobežota informācija par *DPRA* izmantojamību maisījumiem, kuru sastāvs ir zināms (18) (19). Tomēr *DPRA* tiek uzskatīts par tehniski izmantojamu daudzkomponentu vielu un maisījumu ar zināmu sastāvu testēšanai (sk. 18. punktu). Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Pašreizējo prognozes modeli nevar izmantot kompleksiem maisījumiem ar nezināmu sastāvu vai nezināma vai mainīga sastāva vielām, kompleksiem reakcijas produktiem vai bioloģiskiem materiāliem (t. i., *UVCB* vielām), jo testējamai ķimikālijai un peptīdam ir noteikta molārā attiecība. Šim nolūkam būs jāizstrādā jauns, uz gravimetrisko pieeju balstīts prognozes modelis. Gadījumos, kad ir pierādījumi par testēšanas metodes neizmantojamību citām konkrētu kategoriju ķimikālijām, šo testēšanas metodi minētajām konkrētajām ķimikāliju kategorijām neizmanto.

Šī testēšanas metode ir *in chemico* metode, kas neietver metabolisku sistēmu. Ar šo testēšanas metodi nevar detektēt ķimikālijas, kas savu ādas sensibilizācijas potenciālu sasniedz tikai ar fermentatīvo bioaktivāciju (t. i., prohaptēni). Ir ziņots, ka dažos gadījumos ar šo testēšanas metodi tiek pareizi detektētas ķimikālijas, kuras kļūst par sensibilizatoriem pēc abiotiskas transformācijas (t. i., prehaptēni) (18). Ņemot vērā iepriekš minēto, ar šo testēšanas metodi iegūtie negatīvie rezultāti jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar *IATA*. Testējamās ķimikālijas, kas neveido kovalentas saites ar peptīdu, taču sekmē tā oksidēšanos (t. i., cisteīna dimerizēšanos), varētu veicināt peptīdu samazinājuma pārvērtēšanu, kā rezultātā varētu rasties pseidopozitīvas prognozes un/vai ķimikālija varētu tikt klasificēta augstākā reaģētspējas klasē (sk. 29. un 30. punktu).

Kā norādīts, *DPRA* palīdz ādas sensibilizatorus noškirt no ādas nesensibilizatoriem. Integrētā pieejā, piem., *IATA*, tas var palīdzēt novērtēt arī sensibilizācijas potenci. Tomēr, lai noteiktu, kā *DPRA* rezultāti varētu ļaut spriest par potences novērtējumu, jāveic turpmākas darbības, vēlams, pamatojoties uz datiem par cilvēkiem.

TESTA PRINCIPS

DPRA ir *in chemico* metode, ar ko skaitliski izsaka cisteīnu vai lizīnu saturošu peptīdu atlikušo koncentrāciju pēc 24 stundu inkubācijas ar testējamo ķimikāliju 25±2,5 °C temperatūrā. Sintētiskie peptīdi satur fenilalanīnu, kas atvieglo detektēšanu. Peptīdu relatīvo koncentrāciju mēra, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidrumhromatogrāfiju (*HPLC*) ar gradienta eluēšanu un UV detektēšanu pie 220 nm. Pēc tam aprēķina cisteīna un lizīna peptīdu procentuālā samazinājuma vērtības un tās izmanto prognozes modelī (sk. 29. punktu), kas testējamo ķimikāliju ļauj klasificēt vienā no četrām reaģētspējas klasēm, ko izmanto, lai ādas sensibilizatorus noškirtu no ādas nesensibilizatoriem.

▼M7

Pirms šajā testēšanas metodē aprakstītās metodes regulāras izmantošanas laboratorijām uzskatāmi jāapliecina sava tehniskā kompetence, izmantojot 2. papildinājumā uzskaitītās desmit standartvielas.

PROCEDŪRA

Šī testēšanas metode ir balstīta uz *DPRA DB-ALM* protokolu Nr. 154 (20), kas ir *EURL ECVAM* koordinētajā validācijas pētījumā izmantotais protokols. Šo metodi īstenojot un izmantojot laboratorijā, ieteicams lietot šo protokolu. Turpmāk sniegts galveno *DPRA* komponentu un procedūru apraksts. Izmantojot alternatīvu *HPLC* sistēmu, jāpierāda tās līdzvērtība *DB-ALM* protokolā aprakstītajai validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas).

Cisteīnu vai lizīnu saturošo peptīdu sagatavošana

Tieši pirms inkubācijas ar testējamo ķimikāliju jāsagatavo svaigi cisteīnu (Ac-RFAA**C**AA-COOH) un lizīnu (Ac-RFAA**K**AA-COOH) saturoši sintētisko peptīdu izejšķīdumi ar tīrību, kas pārsniedz 85 % un, vēlams, ir diapazonā 90–95 %. Cisteīna peptīda galīgajai koncentrācijai pH 7,5 fosfāta buferšķīdumā jābūt 0,667 mM, savukārt lizīna peptīda galīgajai koncentrācijai pH 10,2 amonija acetāta buferšķīdumā jābūt 0,667 mM. Jāizveido *HPLC* testēšanas sērija, lai *HPLC* analīzes laiks nesasniegtu 30 stundas. Attiecībā uz validācijas pētījumā un šajā testēšanas metodē aprakstīto *HPLC* sistēmu vienā *HPLC* testēšanas reizē iespējams izmantot līdz 26 analīzes paraugus (kas ietver testējamo ķimikāliju, pozitīvo kontroli un attiecīgu šķīdinātāja kontroļu skaitu atkarībā no testā izmantoto atsevišķo šķīdinātāju skaita, katru testējot triplikātā). Visiem vienā testēšanas reizē analizētajiem replikātiem jāizmanto identiski cisteīna un lizīna peptīdu izejšķīdumi. Pirms katras peptīdu partijas izmantošanas ieteicams pierādīt, ka tie pienācīgi šķīst.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

Testējamās ķimikālijas šķīdība attiecīgajā šķīdinātājā jānovērtē pirms testa veikšanas, ievērojot *DPRA DB-ALM* protokolā aprakstīto solubilizācijas procedūru (20). Atbilstošs šķīdinātājs testējamo ķimikāliju izšķīdinās pilnīgi. Tā kā *DPRA* testējamo ķimikāliju pārmērīgi lielā daudzumā inkubē ar cisteīna vai lizīna peptīdiem, iegūtā dzidrā šķidruma vizuāla inspicēšana tiek uzskatīta par pietiekamu, lai pārliecinātos, ka testējamā ķimikālija (un visi tās komponenti, ja testēšanu veic ar daudzkomponentu vielu vai maisījumu) ir izšķīdusi. Piemēroti šķīdinātāji ir acetonitrils, ūdens, ūdens un acetonitrila 1:1 maisījums, izopropanols, acetons vai acetona un acetonitrila 1:1 maisījums. Iespējams izmantot citus šķīdinātājus, ja vien tie neietekmē peptīda stabilitāti, ko uzrauga, izmantojot referenckontroles C (t. i., paraugus, kas sastāv vienīgi no peptīda, kurš izšķīdināts atbilstošajā šķīdinātājā; sk. 3. papildinājumu). Ja citas iespējas nav un testējamā ķimikālija nešķīst nevienā no šiem šķīdinātājiem, jācenšas to izšķīdināt 300 µL *DMSO* un iegūto šķīdumu atšķaidīt ar 2 700 µL acetonitrila un, ja testējamā ķimikālija šajā maisījumā nešķīst, jācenšas tādu pašu testējamās ķimikālijas daudzumu izšķīdināt 1 500 µL *DMSO* un iegūto šķīdumu atšķaidīt ar 1 500 µL acetonitrila. Testējamā ķimikālija pirms apstrādes jānosver stikla stobriņos un tieši pirms testēšanas jāizšķīdina piemērotā šķīdinātājā, lai sagatavotu 100 mM šķīduma. Maisījumiem un daudzkomponentu vielām ar zināmu sastāvu kopējo tīrību nosaka, sasummējot tā komponentu (izņemot ūdeni) daļas, un kopējo šķietamo molekulmasu nosaka,

▼M7

ņemot vērā katra maisījuma komponenta (izņemot ūdeni) individuālo molekulmasu un īpatsvaru. Rezultātā iegūtā tīrība un šķietamā molekulmasa jāizmanto, lai aprēķinātu 100 nM šķīduma sagatavošanai nepieciešamo testējamās ķimikālijas masu. Attiecībā uz polimēriem, kuriem nav iespējams noteikt dominējošo molekulmasu, sagatavojot 100 nM šķīduma, var ņemt vērā monomēra molekulmasu (vai dažādo polimēra saturēto monomēru šķietamo molekulmasu). Tomēr, testējot maisījumus, daudzkomponentu vielas vai polimērus ar zināmu sastāvu, jāapsver arī iespēja testēt neatšķaidītu testējamo ķimikāliju. Šķidras neatšķaidītās ķimikālijas jātestē bez jebkādas iepriekšējas atšķaidīšanas, tās inkubējot molārajā attiecībā 1:10 un 1:50 attiecīgi ar cisteīna un lizīna peptīdiem. Cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina līdz maksimālajai šķīstošajai koncentrācijai tajā pašā šķīdinātājā, kas izmantots, lai sagatavotu šķietamo 100 mM šķīdumu. Pēc tam to testē, neveicot nekādu papildu atšķaidīšanu, to inkubējot attiecībā 1:10 un 1:50 attiecīgi ar cisteīna un lizīna peptīdiem. Ja rezultāti (reaģētspējīgs vai reaģētnespējīgs), kas iegūti ar šķietamo 100 mM šķīdumu un neatšķaidīto ķimikāliju, sakrīt, tiem vajadzētu ļaut izdarīt skaidru secinājumu.

Pozitīvās kontroles, referenckontroļu un koelūcijas kontroļu sagatavošana

Par pozitīvo kontroli jāizmanto kanēļskābes aldehīds (*CAS* Nr. 104-55-2; ≥ 95 % pārtikas tīrība) koncentrācijā 100 mM acetonitrilā. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus testēšanas pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles, vēlams, tādas, kam raksturīgas vidējas samazinājuma vērtības. Turklāt *HPLC* testēšanas sekvencē jāiekļauj arī referenckontroles (t. i., paraugi, kuri satur vienīgi atbilstošajā šķīdinātājā izšķīdinātu peptīdu), un tās izmanto, lai pirms analīzes verificētu *HPLC* sistēmas piemērotību (referenckontroles A), referenckontroļu stabilitāti laika griezumā (referenckontroles B) un to, ka testējamās ķimikālijas izšķīdināšanai izmantotais šķīdinātājs neietekmē peptīdu procentuālo samazinājumu (referenckontroles C) (sk. 3. papildinājumu). Katrai ķimikālijai izmanto atbilstošu referenckontroli, lai aprēķinātu attiecīgās ķimikālijas peptīdu procentuālo samazinājumu (sk. 26. punktu). Turklāt par katru analizēto testējamo ķimikāliju testēšanas sekvencē jāiekļauj koelūcijas kontrole, kas sastāv vienīgi no testējamās ķimikālijas, lai detektētu testējamās ķimikālijas iespējamu koelūciju ar lizīna vai cisteīna peptīdu.

Testējamās ķimikālijas inkubācija ar cisteīna un lizīna peptīdu šķīdumiem

Cisteīna un lizīna peptīdu šķīdumi jāinkubē stikla autosamplera stobriņos ar testējamo ķimikāliju attiecīgi attiecībā 1:10 un 1:50. Ja tūlīt pēc testējamās ķimikālijas šķīduma pievienošanas peptīdu šķīdumam ir novērojamas nogulsnes, jo testējamā ķimikālija slikti šķīst ūdenī, nav iespējams droši zināt, cik liels testējamās ķimikālijas daudzums ir palicis šķīdumā reaģēšanai ar peptīdu. Tāpēc tādā gadījumā joprojām iespējams izmantot pozitīvu rezultātu, taču negatīvais rezultāts nav skaidrs un jāinterpretē piesardzīgi (sk. arī 11. punkta noteikumus par tādu ķimikāliju testēšanu, kuras nešķīst līdz koncentrācijai 100 mM). Reakcijas šķīdumu pirms *HPLC* analīzes atstāj tumsā 25±2,5°C temperatūrā uz 24±2 stundām. Katra testējamā ķimikālija attiecībā uz abiem peptīdiem jāanalizē triplikātā. Pirms *HPLC* analīzes paraugus vizuāli pārbauda. Ja novērojamas nogulsnes vai fāzu atdalīšanās, paraugus var nelielā ātrumā centrifugēt (100–400 xg), lai nogulsnes piesardzības nolūkos nospiestu stobriņa apakšdaļā, jo lieli nogulšņu daudzumi var aizsprostot *HPLC* caurulītes vai kolonnas. Ja nogulsnes vai fāzu atdalīšanās ir novērojamas pēc inkubācijas perioda, peptīdu samazinājums var tikt novērtēts pārāk zemu un rezultātā var nebūt iespējams pietiekami pārliecinoši konstatēt reaģētnespēju negatīva rezultāta gadījumā.

▼M7

***HPLC* standarta kalibrācijas līknes sagatavošana**

Gan cisteīna, gan lizīna peptīdiem jāizveido standarta kalibrācijas līkne. Peptīda standartvielas jāsagatavo 20 % vai 25 % acetonitrila/buferšķīduma šķīdumā, cisteīna peptīdam izmantojot fosfāta buferšķīdumu (pH 7,5), bet lizīna peptīdam — amonija acetāta buferšķīdumu (pH 10,2). Izmantojot peptīda izejšķīduma sērijveida atšķaidīšanu (0,667 mM), jāsagatavo 6 kalibrēšanas šķīdumi, lai aptvertu diapazonu no 0,534 līdz 0,0167 mM. Standarta kalibrācijas līknē jāietver arī atšķaidīšanas buferšķīduma tukšais paraugs. Pienācīgām kalibrācijas līknēm r^2>0,99.

***HPLC* sagatavošana un analīze**

Pirms analīzes veikšanas jāpārbauda *HPLC* sistēmas piemērotība. Peptīdu samazinājumu monitorē, izmantojot *HPLC* un UV detektoru (fotodiožu matricas detektoru vai fiksētu viļņa garuma absorbcijas detektoru ar 220 nm signālu). *HPLC* sistēmā uzstāda pienācīgu kolonnu. Validētajā protokolā aprakstītajā *HPLC* sistēmā kā vēlamo kolonnu izmanto *Zorbax* SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 mikroni. Ar šo apgrieztās fāzes *HPLC* kolonnu vismaz 2 stundas pirms testa veikšanas visa sistēma jālīdzsvaro 30 °C ar 50 % fāzi A (0,1 % (tilp./tilp.) trifluoretiķskābes ūdenī) un ar 50 % fāzi B (0,085 % (tilp./tilp.) trifluoretiķskābes acetonitrilā). *HPLC* analīze jāveic 10 minūtes pie caurplūduma 0,35 ml/min un ar lineāro gradientu 10 % līdz 25 % acetonitrila, kam seko straujš palielinājums līdz 90 % acetonitrila pārējo materiālu noņemšanai. Jāinžektē vienāds tilpums katras standartvielas, parauga un kontroles. Kolonna 7 minūtes starp inžekcijām atkārtoti jālīdzsvaro. Ja tiek izmantota atšķirīga apgrieztās fāzes *HPLC* kolonna, var būt nepieciešams koriģēt iepriekš aprakstītos sistēmas parametrus, lai nodrošinātu cisteīna un lizīna peptīdu pienācīgu eluēšanu un integrāciju, tostarp inžekcijas tilpumu, kas var atšķirties atkarībā no izmantotās sistēmas (parasti 3–10 µl diapazonā). Ja izmanto alternatīvu *HPLC* sistēmu, ir svarīgi pierādīt tās līdzvērtību iepriekš aprakstītajai validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas). Absorbciju monitorē pie 220 nm. Izmantojot fotodiožu matricas detektoru, jāreģistrē arī absorbcija pie 258 nm. Jāpiebilst, ka dažreiz apstrāde ar acetonitrilu var negatīvi ietekmēt peptīdu stabilitāti, un, izmantojot jaunu acetonitrila partiju, tas jānovērtē. 220 nm smailes laukuma un 258 nm smailes laukuma attiecību var izmantot par koelūcijas rādītāju. Attiecībā uz katru paraugu attiecība diapazonā no 90 % līdz 100 % no kontrolparaugu laukumu attiecības vidējās vērtības ([1]) būtu labs indikators, ka koelūcija nav notikusi.

Var būt tādas testējamās ķimikālijas, kuras varētu sekmēt cisteīna peptīda oksidēšanos. Dimerizēta cisteīna peptīda smaili var monitorēt vizuāli. Ja ir novērojama dimerizācija, tā jāpiefiksē, jo tā var novest pie peptīda procentuālā samazinājuma pārvērtēšanas, kā rezultātā var rasties pseidopozitīvas prognozes un/vai ķimikālija var tikt klasificēta augstākā reaģētspējas klasē (sk. 29. un 30. punktu).

HPLC analīzi cisteīna un lizīna peptīdiem var veikt līdztekus (ja ir pieejamas divas *HPLC* sistēmas) vai atsevišķās dienās. Ja analīzi veic atsevišķās dienās, visus testējamās ķimikālijas šķīdumus katrā no dienām abiem testiem sagatavo no jauna. Analīzē jāveic laika uzskaite, lai nodrošinātu, ka pirmā parauga inžektēšana sākas 22 līdz 26 stundas pēc testējamās ķimikālijas sajaukšanas ar peptīda

([1]) Ar "vidējo vērtību" visā dokumentā apzīmē vidējo aritmētisko.

▼M7

šķīdumu. Jāizveido *HPLC* testēšanas sekvence, lai *HPLC* analīzes laiks nesasniegtu 30 stundas. Validācijas pētījumā un šajā testēšanas metodē aprakstītajā *HPLC* sistēmā vienā *HPLC* izpildes reizē var iekļaut līdz pat 26 analīzes paraugus (sk. arī 17. punktu). *HPLC* analīzes sekvences piemērs ir sniegts 3. papildinājumā.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

Cisteīna vai lizīna peptīda koncentrāciju nosaka fotometriski pie 220 nm katrā paraugā, izmērot attiecīgo smailes laukumu (laukumu zem līknes, *AUC*) un aprēķinot peptīda koncentrāciju, izmantojot lineārās kalibrācijas līkni, kas iegūta no standartvielām.

Peptīda procentuālo samazinājumu katrā paraugā nosaka, izmērot smailes laukumu un to izdalot ar attiecīgo referenckontroļu C vidējo smailes laukumu (sk. 3. papildinājumu) saskaņā ar turpmāk norādīto formulu.

$$Percent\ peptide\ depletion = \left[1 - \left(\frac{Peptide\ peak\ area\ in\ replicate\ injection}{Mean\ peptide\ peak\ area\ in\ reference\ controls\ C}\right)\right] \times 100$$

Pieņemšanas kritēriji

Lai testa izpildi varētu uzskatīt par derīgu, tai jāatbilst šādiem kritērijiem:

a) standarta kalibrācijas līknei jābūt r^2>0,99;

b) attiecībā uz pozitīvas kontroles kanēļskābes aldehīdu trīs replikātu peptīdu procentuālā samazinājuma vidējai vērtībai jābūt 60,8 %–100 % robežās cisteīna peptīdam un 40,2 %–69,0 % robežās lizīna peptīdam, un pozitīvās kontroles replikātu maksimālajai standartnovirzei (SN) jābūt <14,9 % cisteīna procentuālajam samazinājumam un <11,6 % lizīna procentuālajam samazinājumam; un

c) referenckontroļu A peptīda vidējai koncentrācijai jābūt 0,50±0,05 mM un deviņu referenckontroļu B un C peptīdu smaiļu smailes laukumu variācijas koeficientam (VK) acetonitrilā jābūt <15,0 %.

Ja viens vai vairāki no šiem kritērijiem nav izpildīti, tests jāatkārto.

Lai attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus varētu uzskatīt par derīgiem, tiem jāatbilst šādiem kritērijiem:

a) testējamās ķimikālijas replikātu maksimālajai standartnovirzei jābūt <14,9 % cisteīna procentuālajam samazinājumam un <11,6 % lizīna procentuālajam samazinājumam;

b) trīs referenckontroļu C vidējai peptīdu koncentrācijai atbilstošajā šķīdinātājā jābūt 0,50±0,05 mM. Ja šie kritēriji nav izpildīti, dati jāatzīst par nederīgiem un konkrētās testējamās ķimikālijas tests jāatkārto.

Prognozes modelis

Aprēķina katras testējamās ķimikālijas cisteīna un lizīna vidējo procentuālo samazinājumu. Vidējās vērtības aprēķinos negatīvu samazinājumu uzskata par "0". Izmantojot 1. tabulā norādīto cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modeli, ādas sensibilizatoru nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem saskaņā ar *IATA* jāizmanto vidējā peptīdu samazinājuma sliekšņvērtība 6,38 %. Prognozes modeļa pielietošana testējamās ķimikālijas klasificēšanai reaģētspējas klasē (t. i., zema, vidēja vai augsta reaģētspēja), iespējams, varētu izrādīties noderīga potences novērtēšanai saskaņā ar *IATA*.

▼M7

1. tabula

Cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modelis (1)

Cisteīna un lizīna vidējais samazinājums (%)	Reaģētspējas klase	*DPRA* prognoze (2)
0 % ≤ vidējais procentuālais samazinājums ≤ 6,38 %	Nekāda vai minimāla reaģētspēja	Negatīva
6,38 % < vidējs procentuālais samazinājums ≤ 22,62 %	Zema reaģētspēja	Pozitīva
22,62 % < vidējais procentuālais samazinājums ≤ 42,47 %	Vidēja reaģētspēja	
42,47 % < vidējais procentuālais samazinājums ≤ 100 %	Augsta reaģētspēja	

(1) Šie skaitļi norāda uz statistiski ģenerētām sliekšņvērtībām un nav saistīti ar mērījuma precizitāti.
(2) *DPRA* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un atbilstīgi 9. un 12. punkta noteikumiem.

Ir iespējami gadījumi, kad testējamā ķimikālija (viela vai viens vai vairāki daudzkomponentu vielas vai maisījuma komponenti) pie 220 nm uzrāda ievērojamu absorbciju un ir ar tādu pašu aizturlaiku kā peptīds (koelūcija). Koelūciju iespējams novērst, nedaudz pielāgojot *HPLC* sistēmu nolūkā vairāk atdalīt testējamās ķimikālijas un peptīda eluēšanas laiku. Ja, cenšoties novērst koelūciju, izmanto alternatīvu *HPLC* sistēmu, jāpierāda tās līdzvērtība validētajai sistēmai (piem., testējot 2. papildinājumā norādītās standartvielas). Ja rodas koelūcija, peptīda smaili nevar integrēt un nav iespējams aprēķināt peptīda procentuālo samazinājumu. Ja šādas testējamās ķimikālija koelūcija rodas gan ar cisteīna, gan ar lizīna peptīdiem, analīzes rezultāts jānorāda kā "neskaidrs". Gadījumos, kad koelūcija rodas tikai ar lizīna peptīdu, var izmantot 2. tabulā norādīto cisteīna 1:10 prognozes modeli.

2. tabula

Cisteīna 1:10 prognozes modelis (1)

Cisteīna (*Cys*) samazinājums (%)	Reaģētspējas klase	*DPRA* prognoze (2)
0 % ≤ *Cys* procentuālais samazinājums ≤ 13,89 %	Nekāda vai minimāla reaģētspēja	Negatīva
13,89 % < *Cys* procentuālais samazinājums ≤ 23,09 %	Zema reaģētspēja	Pozitīva
23,09 % < *Cys* procentuālais samazinājums ≤ 98,24 %	Vidēja reaģētspēja	
98,24 % < *Cys* procentuālais samazinājums ≤ 100 %	Augsta reaģētspēja	

(1) Šie skaitļi norāda uz statistiski ģenerētām sliekšņvērtībām un nav saistīti ar mērījuma precizitāti.
(2) *DPRA* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un atbilstīgi 9. un 12. punkta noteikumiem.

Var būt citi gadījumi, kad testējamās ķimikālijas un kāda no peptīdiem aizturlaika pārklāšanās ir nepietiekama. Tādos gadījumos peptīda procentuālā samazinājuma vērtības var aplēst un izmantot cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modelī, taču testējamo ķimikāliju nevar precīzi klasificēt reaģētspējas klasē.

▼M7

Ja rezultāts ir nepārprotams, testējamai ķimikālijai vajadzētu pietikt ar vienu *HPLC* analīzi attiecībā gan uz cisteīna, gan lizīna peptīdu. Tomēr gadījumos, kad rezultāti ir tuvu sliekšņvērtībai, ko izmanto, lai izšķirtu starp pozitīviem un negatīviem rezultātiem (t. i., rezultāti ir neskaidri), var būt nepieciešams veikt papildu testēšanu. Ja situācijās, kad vidējais procentuālais samazinājums cisteīna 1:10 / lizīna 1:50 prognozes modelī ir 3 % līdz 10 % diapazonā vai cisteīna procentuālais samazinājums cisteīna 1:10 prognozes modelī ir 9 % līdz 17 % diapazonā, jāapsver testa izpildīšana otru reizi, kā arī trešo reizi, ja pirmajās divās reizēs iegūti nesakritīgi rezultāti.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķimikālija

— Vienkomponenta viela:

  — ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

  — tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

  — apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

  — testētā(-s) koncentrācija(-s),

  — uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

  — ciktāl iespējams, raksturoti ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

  — molekulmasa vai šķietamā molekulmasa maisījumiem/polimēriem ar zināmu sastāvu vai cita pētījuma norisei relevanta informācija,

  — apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

  — testētā(-s) koncentrācija(-s),

  — uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Kontroles

— Pozitīvā kontrole:

  — ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

  — tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

▼M7

— apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

— testētā(-s) koncentrācija(-s),

— uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,

— norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā).

— Šķīdinātājs/nesējs:

— izmantotais šķīdinātājs/nesējs un tā sastāvdaļu attiecība (attiecīgā gadījumā),

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati,

— tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

— ja tiek izmantoti citi, testēšanas metodē neminēti šķīdinātāji/nesēji — fiziskais izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

— uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,

— katrai testējamai ķimikālijai izraudzītā šķīdinātāja pamatojums,

— acetonitrilam — rezultāti testam par ietekmi uz peptīdu stabilitāti.

Peptīdu, pozitīvās kontroles un testējamās ķimikālijas sagatavošana:

— peptīdu šķīdumu raksturojums (piegādātājs, sērijas numurs, precīzs peptīda svars, izejšķīdumam pievienotais tilpums),

— pozitīvās kontroles šķīduma raksturojums (precīzs pozitīvās kontroles vielas svars, testa šķīdumam pievienotais tilpums),

— testējamās ķimikālijas šķīdumu raksturojums (precīzs testējamās ķimikālijas svars, testa šķīdumam pievienotais tilpums).

HPLC instrumenta iestatījumi un analīze

— *HPLC* instrumenta, *HPLC* un aizsargkolonnu, detektora, autosamplera tips,

— *HPLC* analīzei relevantie parametri, piem., kolonnu temperatūra, inžekcijas tilpumi, caurplūdums un gradients.

Sistēmas piemērotība:

— katra standartvielas un referenckontroles A replikāta peptīda smailes laukums pie 220 nm,

— grafiski attēlota lineārā kalibrācijas līkne un norādīts r^2,

— katra referenckontroles A replikāta peptīdu koncentrācija,

— vidējā peptīdu koncentrācija (mM) trīs referenckontrolēs A, standartnovirze (SN) un variācijas koeficients (VK),

— peptīda koncentrācija referenckontrolēs A un C.

▼M7

Analīzes sekvence

— Referenckontrolēm:

  — peptīda smailes laukums pie 220 nm katram B un C replikātam,

  — peptīda vidējais smailes laukums pie 220 nm deviņām referenckontrolēm B un C acetonitrilā, SN un VK (attiecībā uz referenckontroļu stabilitāti analīzes laikā),

  — katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda vidējais smailes laukums pie 220 nm trim atbilstošajām referenckontrolēm C (peptīda procentuālā samazinājuma aprēķināšanai),

  — katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda koncentrācija (mM) trim atbilstošajām referenckontrolēm C,

  — katram izmantotajam šķīdinātājam — peptīda vidējā koncentrācija (mM) trim atbilstošajām referenckontrolēm C, SN un VK,

— Pozitīvajām kontrolēm:

  — peptīda smailes laukums pie 220 nm katram replikātam,

  — peptīda procentuālais samazinājums katram replikātam,

  — trīs replikātu peptīda vidējais procentuālais samazinājums, SN un VK.

— Katrai testējamai ķimikālijai:

  — nogulšņu, ja tādas novērojamas, izskats reakcijas maisījumā inkubācijas perioda beigās; vai nogulsnes tika atkārtoti šķīdinātas vai centrifugētas,

  — koelūcijas esība,

  — jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā),

  — peptīda smailes laukums pie 220 nm katram replikātam,

  — peptīda procentuālais samazinājums katram replikātam,

  — peptīda vidējais procentuālais samazinājums trīs replikātiem, SN un VK,

  — cisteīna procentuālā un lizīna procentuālā samazinājuma vidējās vērtības,

  — izmantotais prognozes modelis un *DPRA* prognoze.

Kompetences testēšana

— Attiecīgā gadījumā procedūra, kas izmantota, lai pierādītu laboratorijas kompetenci šīs testēšanas metodes izpildē (piem., standartvielu testēšana) vai pierādītu testēšanas metodes rezultātu reproducējamību laika griezumā.

Rezultātu iztirzājums

— ar *DPRA* testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums,

— ar testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija.

Secinājumi

▼M7

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Pieejams: 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) Šā pielikuma B.6. nodaļa "Ādas sensibilizācija".

(4) Šā pielikuma B.42. nodaļa "Limfmezglu lokālās stimulācijas tests".

(5) Šā pielikuma B.50. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: *DA*".

(6) Šā pielikuma B.51. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA".

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 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. Pieejams: 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, published online, 14 May 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 Experimental Medicine 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 74pp. Pieejams: 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, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Pieejams: 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. OECD 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 22pp. Pieejams: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (21).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš)**: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* rezultātam (2).

Kalibrēšanas līkne: sakarība starp zināmas vielas eksperimentā noteikto atbildreakcijas vērtību un analītisko koncentrāciju (saukta arī par *standartlīkni*).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Variācijas koeficients: mainības mērs, ko aprēķina replikātu datu grupai, standartnovirzi izdalot ar vidējo vērtību. Lai to izteiktu procentos, to reizina ar 100.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja)**: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Molekulārais iniciācijas notikums: ķimikālijas inducēta bioloģiskās sistēmas perturbācija molekulārā līmenī, kas identificēta kā nelabvēlīga iznākuma ceļa sākumnotikums.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (1).

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masas).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masas) un < 80 % (masas). Daudzkomponentu vielas tiek saražotas. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Referenckontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu

▼M7

testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (21).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā (21).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķimikāliju (sk. "Ticamība") (21).

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (21).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (21).

Viela: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (1).

Sistēmas piemērotība: instrumenta veiktspējas (piem., jutības) noteikšana, analizējot references standartvielu pirms analītiskās partijas izmantošanas (22).

Testējamā ķimikālija: terminu "testējamā ķimikālija" izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO *GHS*): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

UVCB: viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (21).

▼M7

2. papildinājums

STANDARTVIELAS

***In chemico* ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreaģētspējas tests**

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, pareizi nosakot gaidāmo *DPRA* prognozi 1. tabulā ieteiktajām 10 standartvielām un iegūstot cisteīna un lizīna samazinājuma vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā attiecībā uz 8 no 10 standartvielām katram peptīdam. Šīs standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsauces datu pieejamība un kvalitatīvu ar *DPRA* metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība un to izmantotība *EURL ECVAM* koordinētā validācijas pētījumā, lai pierādītu šīs testēšanas metodes sekmīgu īstenošanu laboratorijās, kuras piedalās pētījumā.

1. tabula

Standartvielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot tiešo peptīdreaģētspējas testu

Standartvielas	*CAS* Nr.	Fizikālais stāvoklis	*In vivo* prognoze (1)	*DPRA* prognoze (2)	Cisteīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons (3)	Lizīna peptīda procentuālā samazinājuma diapazons (3)
2,4-dinitrohlor-benzols	97-00-7	Ciets	Sensibilizators (ļoti spēcīgs)	Pozitīvs	90-100	15-45
Oksazolons	15646-46-5	Ciets	Sensibilizators (ļoti spēcīgs)	Pozitīvs	60-80	10-55
Formaldehīds	50-00-0	Šķidrs	Sensibilizators (spēcīgs)	Pozitīvs	30-60	0-24
Benzilidēnacetons	122-57-6	Ciets	Sensibilizators (vidējs)	Pozitīvs	80-100	0-7
Farnezāls	19317-11-4	Šķidrs	Sensibilizators (vājš)	Pozitīvs	15-55	0-25
2,3-Butāndions	431-03-8	Šķidrs	Sensibilizators (vājš)	Pozitīvs	60-100	10-45
1-Butanols	71-36-3	Šķidrs	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5
6-Metilkumarīns	92-48-8	Ciets	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5
Pienskābe	50-21-5	Šķidrs	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5
4-Metoksia-cetofenons	100-06-1	Ciets	Nav sensibilizators	Negatīvs	0-7	0-5,5

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognozes ir balstītas uz *LLNA* datiem (19). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (23).
(2) *DPRA* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un atbilstīgi 9. un 11. punkta noteikumiem.
(3) Diapazoni noteikti, pamatojoties uz vismaz 10 samazinājumu vērtībām, kas iegūtas 6 neatkarīgās laboratorijās.

▼M7

3. papildinājums

ANALĪZES SEKVENCES PIEMĒRI

Kalibrācijas standarti un referenckontroles	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Atšķaidīšanas buferšķīdums Referenckontrole A, replikāts 1 Referenckontrole A, replikāts 2 Referenckontrole A, replikāts 3
Koelūcijas kontroles	Koelūcijas kontrole 1 testējamai ķimikālijai 1 Koelūcijas kontrole 2 testējamai ķimikālijai 2
Standartvielu kontroles	Referenckontrole B, replikāts 1 Referenckontrole B, replikāts 2 Referenckontrole B, replikāts 3
Pirmais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 1 Kanēļskābes aldehīds, replikāts 1 Paraugs 1, replikāts 1 Paraugs 2, replikāts 1
Otrais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 2 Kanēļskābes aldehīds, replikāts 2 Paraugs 1, replikāts 2 Paraugs 2, replikāts 2
Trešais replikātu kopums	Referenckontrole C, replikāts 3 Kanēļskābes aldehīds, replikāts 3 Paraugs 1, replikāts 3 Paraugs 2, replikāts 3
Referenckontroles	Referenckontrole B, replikāts 4 Referenckontrole B, replikāts 5 Referenckontrole B, replikāts 6

Analīzes sekvencē jāiekļauj trīs referenckontroļu kopumi (t. i., paraugi, kuru sastāvā ir vienīgi pienācīgajā šķīdinātājā izšķīdināts peptīds):
Referenckontroli A izmanto, lai verificētu *HPLC* sistēmas piemērotību.
Referenckontroli B iekļauj analīzes sākumā un beigās, lai verificētu referenckontroļu stabilitāti analīzes veikšanas laikā.
Referenckontroli C analīzes sekvencē iekļauj tāpēc, lai apstiprinātu, ka testa ķimikālijas atšķaidīšanai izmantotais šķīdinātājs neietekmē peptīdu procentuālo samazinājumu.

▼M7

B.60. *IN VITRO* ĀDAS SENSIBILIZĀCIJA: *ARE-NRF2* LUCIFERĀZES TESTĒŠANAS METODE

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 442D (2015). Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Šī testēšanas metode piedāvā *in vitro* procedūru (*ARE-Nrf2* luciferāzes analīzi), kas izmantojama, lai saskaņā ar ANO *GHS* (1) un *CLP* regulu ādas sensibilizatorus nošķirtu no ādas nesensibilizatoriem.

Pastāv vispārēja vienprātība par galvenajiem bioloģiskajiem notikumiem, kas ir ādas sensibilizācijas pamatā. Esošās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, *AOP*) (2) — no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei uz veselību, proti, alerģiskam kontaktdermatītam cilvēkos vai kontakthipersensibilizācijai grauzējos (2) (3). Molekulārais iniciācijas notikums ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos. Otrais būtiskais notikums šajā *AOP* notiek keratinocītos un ietver iekaisuma atbildreakcijas, kā arī gēnu ekspresiju, kas saistīta ar konkrētiem šūnu signālceļiem, piem., no antioksidanta/elektrofila atbildreakcijas elementa (*ARE*) atkarīgiem ceļiem. Trešais būtiskais notikums ir dendrītisko šūnu aktivācija, ko parasti novērtē pēc ekspresētajiem specifiskajiem šūnu virsmas marķieriem, hemokīniem un citokīniem. Ceturtais būtiskais notikums ir T šūnu savairošanās, ko peļu limfmezglu lokālās stimulācijas testā novērtē netieši (4).

Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana maksimizācijas testu jūrascūciņām [*Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test*, *GMPT*] un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6 (5)) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas indukcijas fāze, gan tās izpausmes fāze. Atzinīgi novērtēts ir arī tests ar pelēm, proti, limfmezglu lokālās stimulācijas tests [*Local Lymph Node Assay*, *LLNA*] (TM B.42 (4)) un abas šīs metodes modifikācijas, kurās nav radioaktīvo komponentu, proti, *LLNA: DA* (TM B.50 (6)) un *LLNA:BrdU-ELISA* (TM B.51 (7)), kurās visās novērtē vienīgi indukcijas reakciju, jo visas šīs metodes dzīvnieku labturības un objektīva ādas sensibilizācijas indukcijas fāzes mērījuma ziņā ir pārākas par testēšanas metodēm ar jūrascūciņām.

Pēdējā laikā mehānistiskās *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes tiek uzskatītas par zinātniski derīgām metodēm ķimikāliju radīto ādas sensibilizācijas apdraudējumu izvērtēšanai. Tomēr, lai būtu iespējams pilnīgi aizstāt pašreizējos testus ar dzīvniekiem, integrētās testēšanas un novērtēšanas pieejās (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, *IATA*) jākombinē vairākas metodes (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), kurās dzīvniekus neizmanto, ņemot vērā, ka katrai pašreiz pieejamajai bezdzīvnieku metodei ir ierobežots mehānistiskais *AOP* tvērums (2) (3).

Šī testēšanas metode (*ARE-Nrf2* luciferāzes tests) ieteicama 2. punktā minētā otrā būtiskā notikuma izskatīšanai. Ir ziņots, ka ādas sensibilizatori inducē gēnus, kurus regulē antioksidanta atbildreakcijas elements (*ARE*) (8) (9). Tādas nelielas elektrofilas vielas kā ādas sensibilizatori var iedarboties uz sensoro proteīnu

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼M7

Keap1 (*Kelch* tipa ar *ECH* asociētais proteīns 1), piemēram, kovalenti modificējot tā cisteīna atliekas, kā rezultātā tas disociējas no transkripcijas faktora *Nrf2* (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Pēc tam disociētais *Nrf2* var aktivizēt no *ARE* atkarīgos gēnus, piemēram, tādus, kuri kodē II fāzes detoksificējošus fermentus (8) (10) (11).

Patlaban vienīgais *in vitro ARE-Nrf2* luciferāzes tests, ko aptver šī testēšanas metode, ir *KeratinoSens*^{TM} tests, par kuru ir pabeigti validācijas pētījumi (9) (12) (13), kam sekoja neatkarīga profesionālvērtēšana, kuru veica Eiropas Savienības references laboratorija dzīvnieku testēšanai alternatīvu metožu jomā (*EURL ECVAM*) (14). *KeratinoSens*^{TM} tests tika uzskatīts par zinātniski derīgu izmantošanai *IATA* ietvaros nolūkā nošķirt ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem ar mērķi klasificēt un marķēt apdraudējumu (14). Laboratorijas, kuras vēlas izmantot šo testēšanas metodi, var iegūt *KeratinoSens*^{TM} testā izmantoto rekombinanto šūnu līniju, noslēdzot licences līgumu ar šīs testēšanas metodes izstrādātāju (15).

Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI, PIEMĒROJAMĪBA UN IEROBEŽOJUMI

Tā kā *Keap1-Nrf2-ARE* ceļa aktivācija apskata vienīgi otro būtisko ādas sensibilizācijas *AOP* notikumu, uz šā ceļa aktivāciju balstītu testēšanas metožu sniegtā informācija, visticamāk, viena pati nebūs pietiekama, lai izdarītu secinājumu par ķimikāliju radīto ādas sensibilizācijas potenciālu. Tādēļ ar šo testēšanas metodi iegūtie dati jāskata integrētas pieejas, piem., *IATA*, satvarā un jāapvieno ar citu papildinformāciju, piem., tādu, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi būtiski ādas sensibilizācijas *AOP* notikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analoģijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem. Piemēri *ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes izmantošanai kopā ar citu informāciju ir sniegti literatūrā (13) (16) (17) (18) (19).

Šo testēšanas metodi var izmantot tam, lai saskaņā ar *IATA* būtu vieglāk ādas sensibilizatorus (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1. kategorija) nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Šo testēšanas metodi nevar izmantot vienu pašu ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai apakškategorijās 1.A un 1.B saskaņā ar ANO *GHS*/*CLP*, ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumiem. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvu rezultātu var vienu pašu izmantot ķimikālijas klasificēšanai ANO *GHS*/*CLP* 1. kategorijā.

Pamatojoties uz validācijas pētījuma datu kopu un iekšējo testēšanu testēšanas metodes neatkarīgajai profesionālizvērtēšanai, ir pierādīts, ka *KeratinoSens*^{TM} tests ir izmantojams laboratorijās, kurām ir pieredze darbā ar šūnu kultūru. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šīs testēšanas metodes, ir aptuveni 85 % gan tajā pašā laboratorijā, gan citās laboratorijās (14). *KeratinoSens*^{TM} testa pareizība (77 % — 155/201), jutība (78 % — 71/91) un specifiskums (76 % — 84/110) ādas sensibilizatoru (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem salīdzinājumā ar *LNNA* rezultātiem, tika

▼M7

aprēķināti, ņemot vērā visus *EURL ECVAM* datus, kas tika iesniegti testēšanas metodes izvērtēšanai un profesionālizvērtēšanai (14). Šie skaitļi ir līdzīgi tiem, kas nesen publicēti, pamatojoties uz aptuveni 145 vielu iekšējo testēšanu (77 % pareizība, 79 % jutība, 72 % specifiskums) (13). Visticamāk, *KeratinoSens*^{TM} testā pārāk zemu tiks novērtētas tās ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1.B apakškategorija), nevis tās ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO *GHS*/*CLP* 1.A apakškategorija) (13) (14). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka *KeratinoSens*^{TM} tests var palīdzēt identificēt ādas sensibilizācijas apdraudējumus. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *KeratinoSens*^{TM} testu kā atsevišķu testēšanas metodi, ir tikai orientējošas, jo šī testēšanas metode jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem saskaņā ar *IATA* un atbilstīgi 9. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, kā arī citi testi ar dzīvniekiem var nepilnīgi atspoguļot situāciju interesējošajā sugā, t. i., cilvēkos.

Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, un tas nav saistīts ar *ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Pamatojoties uz patlaban pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka *KeratinoSens*^{TM} testu var izmantot testējamām ķimikālijām, kas aptver dažādas organiskās funkcionālās grupas, atbildreakciju mehānismus, ādas sensibilizācijas potenci (kā noteikts *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (9) (12) (13) (14). Galvenokārt tika testētas vienkomponenta vielas, kaut arī ir pieejams neliels daudzums datu arī par maisījumu testēšanu (20). Tomēr šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Tomēr pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Turklāt, testējot daudzkomponentu vielas vai maisījumus, jāapsver iespējamā ietekme, ko citotoksiskie komponenti varētu atstāt uz novērotajām atbildreakcijām. Šī testēšanas metode ir izmantojama testējamajām ķimikālijām, kuras šķīst vai stabili dispersējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķimikālija nenosēžas vai neatdalās no šķīdinātāja dažādās fāzēs) ūdenī vai *DMSO* (tostarp visi testējamās ķimikālijas komponenti, ja testēšana notiek ar daudzkomponentu vielu vai maisījumu). Testējamās ķimikālijas, kuras pie augstākās nepieciešamās galīgās koncentrācijas 2 000 μM (sk. 22. punktu) šiem nosacījumiem neatbilst, joprojām ir iespējams testēt pie zemākām koncentrācijām. Tādā gadījumā rezultātus, kuri atbilst 39. punktā aprakstītajiem pozitīvuma kritērijiem, joprojām varētu izmantot, lai testējamo ķimikāliju identificētu kā ādas sensibilizatoru, turpretī negatīvs rezultāts, kas iegūts pie koncentrācijas < 1 000 μM, jāuzskata par neskaidru (sk. prognozes modeli 39. punktā). Kopumā vielas, kuru *LogP* nepārsniedz 5, ir veiksmīgi testētas, turpretī stipri hidrofobas vielas, kuru *LogP* pārsniedz 7, atrodas ārpus testēšanas metodes zināmās izmantojamības (14). Par vielām, kuru *LogP* atrodas 5–7 robežās, ir pieejama vienīgi ierobežota informācija.

Negatīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi, jo vielas, kas reaģē tikai ar lizīna atliekām, ar šo testēšanas metodi var detektēt kā negatīvas. Turklāt izmantotās šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās kapacitātes (21) un eksperimentālo apstākļu dēļ negatīvus rezultātus var iegūt arī ar prohaptēniem (t. i., ķimikālijām, kurām nepieciešama fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) un prehaptēniem (t. i., ķimikālijām, kuras aktivizē ar autooksidēšanos), jo īpaši tad, ja oksidācija norit lēni. No otras puses, testējamās ķimikālijas, kuras neiedarbojas kā sensibilizators, bet tik un tā ir ķīmiski stresori, var radīt pseidopozitīvus rezultātus (14). Turklāt ne vienmēr ir iespējams ticami novērtēt ārkārtīgi citotoksiskas testējamās ķimikālijas. Visbeidzot, testējamās ķimikālijas, kuras ietekmē luciferāzes fermentu, var radīt maldīgu priekšstatu par luciferāzes aktivitāti uz šūnām

▼M7

balstītās analīzēs, izraisot vai nu šķietamu inhibēšanos, vai pastiprinātu luminiscenci (22). Piem., ir ziņots, ka fitoestrogēna koncentrācijas, kas lielākas par 1 μM, citos uz luciferāzi balstītos ziņotājgēnu testos radījušas luminiscences signālu traucējumus luciferāzes ziņotājgēna pārmērīgas aktivācijas dēļ (23). Tāpēc piesardzīgi jāizmeklē luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai tādu līdzīgu ķimikāliju koncentrācijām, par kurām ir aizdomas, ka tās rada fitoestrogēnam līdzīgu pārmērīgu luciferāzes ziņotājgēna aktivāciju (23). Gadījumos, kad ir iespējams pierādīt, ka testēšanas metode nav pielietojama citām konkrētām testējamo ķimikāliju kategorijām, šo testēšanas metodi minētajām konkrētajām kategorijām neizmanto.

Papildus tam, ka *KeratinoSens*^{TM} tests palīdz nošķirt ādas sensibilizatorus no ādas nesensibilizatoriem, tas arī sniedz informāciju par koncentrāciju–atbildreakciju, kas var palīdzēt novērtēt sensibilizatora potenci, ja to izmanto integrētās pieejās, piem., *IATA* (19). Tomēr jāveic turpmāks darbs, ko vēlams balstīt uz uzticamiem datiem par cilvēkiem, lai noteiktu, kā *KeratinoSens*^{TM} testa rezultāti var palīdzēt novērtēt potenci (24) un sensibilizatorus klasificēt apakškategorijās saskaņā ar ANO *GHS*/*CLP*.

TESTA PRINCIPS

ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metodē tiek izmantota imortalizēta adherento šūnu līnija, kas iegūta no *HaCaT* cilvēka keratinocītiem, kuri stabili transfektēti ar selektējamu plazmīdu. Šī šūnu līnija satur luciferāzes gēnu, ko transkriptīvi kontrolē konstitutīvs promoters, kurš ir savienojies ar *ARE* elementu no gēna, par ko ir zināms, ka kontaktsensibilizators palielina tā ekspresiju (25) (26). Luciferāzes signāls atspoguļo to, ka sensibilizatori aktivējuši no endogēnā *Nrf2* atkarīgos gēnus, un ir pierādīta luciferāzes signāla atkarība no *Nrf2* rekombinantajā šūnu līnijā (27). Tas ļauj kvantitatīvi (ar luminiscences detekciju) izmērīt luciferāzes gēna indukciju, izmantojot labi zināmus gaismu radošus luciferāzes substrātus, kas kalpo par *Nrf2* transkripcijas faktora aktivitātes rādītāju šūnās pēc to ekspozīcijas elektrofilām vielām.

Testējamās ķimikālijas *KeratinoSens*™ testā tiek uzskatītas par pozitīvām, ja tās izraisa statistiski nozīmīgu luciferāzes aktivitātes indukciju, kas pārsniedz doto sliekšņvērtību (t. i., > 1,5-kārtīgs jeb 50 % pieaugums), zem noteiktas koncentrācijas, kam nav būtiskas ietekmes uz šūnu dzīvotspēju (t. i., zem 1 000 μM, un pie koncentrācijas, kurā šūnu dzīvotspēja pārsniedz 70 % (9) (12)). Šim nolūkam tiek noteikta luciferāzes aktivitātes maksimālā indukcija kārtās attiecībā pret šķīdinātāja (negatīvo) kontroli (I_{max}). Turklāt, tā kā šūnas tiek eksponētas testējamās ķimikālijas koncentrāciju sērijai, no devas–atbildreakcijas līknes jāinterpolē, pie kādas koncentrācijas luciferāzes aktivitāte tiek inducēta statistiski nozīmīgi virs sliekšņvērtības (t. i., $EC_{1,5}$ vērtība) (aprēķinus sk. 32. punktā). Visbeidzot, līdztekus jāveic citotoksicitātes mērījumi, lai novērtētu, vai luciferāzes aktivitātes indukcijas līmeņi ir novērojami pie subcitotoksiskām koncentrācijām.

Pirms šai testēšanas metodei atbilstoša *ARE-Nrf2* luciferāzes testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 2. papildinājumā uzskaitītās desmit standartvielas.

Lai būtu vieglāk validēt jaunas vai grozītas *in vitro ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes, kas līdzinās *KeratinoSens*™ testam, un lai šo testēšanas metodi būtu iespējams savlaicīgi grozīt ar mērķi tajā iekļaut šīs metodes, ir pieejami veiktspējas standarti (VS) (28) Attiecībā uz testēšanas metodēm, kuras validētas saskaņā ar VS, datu savstarpējā atzīšana (*Mutual Acceptance of Data*, *MAD*) saskaņā ar ESAO nolīgumu būs garantēta tikai tad, ja ESAO šīs testēšanas metodes būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā.

▼M7

PROCEDŪRA

Patlaban vienīgā metode, ko aptver šī testēšanas metode, ir zinātniski derīgais *KeratinoSens*^{TM} tests (9) (12) (13) (14). *KeratinoSens*^{TM} testam ir pieejamas standartprocedūras, kas jāizmanto, šo testēšanas metodi ieviešot un izmantojot laboratorijā (15). Laboratorijas, kuras vēlas šo testēšanas metodi ieviest, var iegūt *KeratinoSens*^{TM} testā izmantoto rekombinanto šūnu līniju, noslēdzot licences līgumu ar šīs testēšanas metodes izstrādātāju. Turpmākajos punktos sniegts *ARE Nrf2* luciferāzes testēšanas metodes galveno komponentu un procedūru apraksts.

Keratinocītu kultūru sagatavošana

Jāizmanto transgēnu šūnu līnija, kam ir stabila luciferāzes ziņotājgēna insercija, ko kontrolē *ARE* elements (piem., *KeratinoSens*™ šūnu līnija). Saņemot šūnas, tās pavairo (piem., 2–4 pasāžas) un uzglabā sasaldētas kā viendabīgu krājumu. Šūnas no šā sākotnējā krājuma var pavairot līdz maksimālajam pasāžu skaitam (t. i., 25 pasāžas *KeratinoSens*^{TM} gadījumā), un ar tām veic parasto testēšanu, kurā izmanto atbilstošu uzturēšanas barotni (*KeratinoSens*^{TM} testam tā ir serumu un geneticīnu saturoša *DMEM*).

Veicot testēšanu, šūnu konfluencei jābūt 80–90 % robežās, un jārūpējas, lai šūnas nekad nesasniegtu pilnīgu konfluenci. Dienu pirms testēšanas šūnas ievāc un sadala pa 96 iedobju platēm (10 000 šūnas uz vienu plati *KeratinoSens*^{TM} gadījumā). Jāpievērš uzmanība, lai šūnu uzsēšanas laikā novērstu to sedimentāciju, tādējādi nodrošinot šūnu skaita vienmērīgu sadalījumu pa iedobēm. Ja to nedara, šajā solī starp iedobēm var rasties lielas atšķirības. Luciferāzes aktivitātes mērījumu nolūkā katram atkārtojumam izmanto trīs replikātus; vienu paralēlu replikātu izmanto šūnu dzīvotspējas testam.

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu sagatavošana

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. *KeratinoSens*^{TM} testa nolūkam testējamās ķimikālijas līdz vēlamajai galakoncentrācijai (piem., 200 nM) izšķīdina dimetilsulfoksīdā (*DMSO*). *DMSO* šķīdumus var uzskatīt par pašsterilizējošiem, līdz ar to nav jāveic sterilizējošā filtrēšana jeb sterilfiltrēšana. *DMSO* nešķīstošu testējamo ķimikāliju izšķīdina sterilā ūdenī vai barotnē un šķīdumus sterilizē, piem., ar filtrēšanu. Ja testējamajai ķimikālijai nav noteiktas molekulmasas, izejšķīdumu sagatavo līdz noklusējuma koncentrācijai (*KeratinoSens*^{TM} testā 40 mg/mL vai 4 % (masas)). Ja tiek izmantoti citi šķīdinātāji, nevis *DMSO*, ūdens vai barotne, jāsniedz pietiekams zinātniskais pamatojums.

Par pamatu ņemot testējamās ķimikālijas *DMSO* izejšķīdumus, ar *DMSO* sagatavo sērijveida atšķaidījumus, lai iegūtu 12 testējamās ķimikālijas galvenās koncentrācijas (no 0,098 līdz 200 mM *KeratinoSens*^{TM} testā). Ja testējamā ķimikālija *DMSO* nešķīst, atšķaidījumus galveno koncentrāciju iegūšanai sagatavo, izmantojot sterilu ūdeni vai sterilu barotni. Neatkarīgi no izmantotā šķīdinātāja pēc tam galvenās koncentrācijas 25-kārtīgi izšķīdina serumu saturošā barotnē un visbeidzot izmanto apstrādei ar papildu četrkārtīgu atšķaidījuma koeficientu, lai testētās ķimikālijas galīgās koncentrācijas *KeratinoSens*^{TM} testā būtu diapazonā no 0,98 līdz 2 000 μM. Pienācīgi pamatojot, drīkst izmantot citas koncentrācijas (piem., citotoksicitātes vai vājas šķīdības gadījumā).

KeratinoSens^{TM} testā izmantotā negatīvā (šķīdinātāja) kontrole ir *DMSO* (*CAS* Nr. 67-68-5, tīrība ≥ 99 %), kurai izmanto sešas iedobes uz plati. Tam veic tādu pašu atšķaidīšanu, kā aprakstīts 22. punktā attiecībā uz galvenajām koncentrācijām, lai galīgā negatīvās (šķīdinātāja) kontroles koncentrācija būtu 1 %, par

▼M7

kuru ir zināms, ka tā neietekmē šūnu dzīvotspēju un atbilst tai pašai *DMSO* koncentrācijai, kāda ir testētajā ķimikālijā un pozitīvajā kontrolē. Ja testējamā ķimikālija *DMSO* nešķīst un tās atšķaidījumi tika sagatavoti, izmantojot ūdeni, galīgā testa šķīduma *DMSO* līmenis visās iedobēs jākoriģē uz 1 %, tāpat kā pārējām testējamām ķimikālijām un kontroles vielām.

KeratinoSens^{TM} testā izmantotā pozitīvā kontrole ir kanēļskābes aldehīds (*CAS* Nr. 14371-10-9, tīrība ≥ 98 %), kurai sagatavo 5 galveno koncentrāciju sēriju *DMSO* ar diapazonu no 0,4 līdz 6,4 mM (no 6,4 mM izejšķīduma) un atšķaida tā, kā aprakstīts 22. punktā attiecībā uz galvenajām koncentrācijām, lai galīgā pozitīvās kontroles koncentrācija būtu diapazonā no 4 līdz 64 μM. Citas piemērotas pozitīvās kontroles, kurām būtu jāsniedz $EC_{1,5}$ diapazona vidējās vērtības, var izmantot, ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes pieņemamības kritērijus.

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

Lai iegūtu prognozi (pozitīvu vai negatīvu), katrai testējamai ķimikālijai un pozitīvās kontroles vielai ir nepieciešams viens eksperiments, kas sastāv no vismaz diviem neatkarīgiem atkārtojumiem, kuri katrs satur trīs replikātus (t. i., n = 6). Ja divos neatkarīgajos atkārtojumos iegūti nesakritīgi rezultāti, jāveic trešais atkārtojums, kurā izmanto trīs replikātus (t. i., n = 9). Katru neatkarīgo atkārtojumu veic citā dienā ar svaigu testējamo ķimikāliju izejšķīdumu un atsevišķi ievāktām šūnām. Tomēr šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas.

Pēc uzsēšanas, kā aprakstīts 20. punktā, šūnas 24 stundas audzē 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs. Pēc tam barotni novāc un aizstāj ar svaigu barotni (*KeratinoSens*^{TM} gadījumā 150 μl barotni, kurā ir serums, bet nav geneticīna), kam pievieno 50 μl 25-kārtīgi atšķaidītas testējamās ķimikālijas un kontroles vielu. Katrā platē vismaz vienu iedobi atstāj tukšu (bez šūnām un bez apstrādes), lai iegūtu fona vērtības.

Pēc tam *KeratinoSens*^{TM} testā sagatavotās plates aptuveni 48 stundas inkubē 37±1°C temperatūrā, klātesot 5 % CO_2. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plates pārklājot ar foliju.

Luciferāzes aktivitātes mērījumi

Lai nodrošinātu pienācīgus luminiscences rādījumus, būtiski ir trīs faktori:

— jutīga luminometra izvēle,

— pietiekami augstas plates izmantošana, lai novērstu šķērskontamināciju ar gaismu, un

— tāda luciferāzes substrāta izmantošana, kam ir pietiekama gaismas atdeve, lai nodrošinātu pietiekamu jutību un zemu mainīgumu.

Pirms testēšanas jāizpilda 3. papildinājumā aprakstītais kontroleksperiments, lai nodrošinātu, ka šie trīs punkti tiek izpildīti.

Pēc 48 stundu ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai un kontroles vielām *KeratinoSens*^{TM} testā šūnas nomazgā ar fosfātu buferšķīdumu un katrai iedobei uz 20 minūtēm istabas temperatūrā pievieno attiecīgo līzes buferšķīdumu, lai iegūtu luminiscences nolasījumus.

▼M7

Pēc tam plates ar šūnu lizātu nolasījumu veikšanai ievieto luminometrā, kas *KeratinoSens*^{TM} testā ir ieprogrammēts: (i) katrai iedobei pievienot luciferāzes substrātu (t. i., 50 µl), (ii) pagaidīt 1 sekundi, un (iii) 2 sekundes integrēt luciferāzes aktivitāti. Ja izmanto alternatīvus iestatījumus, piem., atkarībā no izmantotā luminometra modeļa, tie jāpamato. Turklāt, ja tiek sekmīgi izpildīts 3. papildinājumā paredzētais kvalitātes kontroles eksperiments, var izmantot arī spīdošu substrātu.

Citotoksicitātes novērtējums

Veicot *KeratinoSens*^{TM} šūnu dzīvotspējas testu, 48 stundas pēc ekspozīcijas barotni aizstāj ar svaigu barotni, kas satur *MTT* (3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīdu, tiazolilzilo tetrazolija bromīdu, *CAS* Nr. 298-93-1), un šūnas 4 stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2. Pēc tam *MTT* barotni novāc un šūnas lizē (piem., katrai iedobei pievienojot 10 % *SDS* šķīdumu) līdz nākamajai dienai. Pēc sakratīšanas ar fotometru mēra absorbciju, t. i., pie 600 nm.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Datu izvērtēšana

KeratinoSens^{TM} testā aprēķina šādus parametrus:

— luciferāzes aktivitātes indukcijas (I_{max}) maksimālo vidējo vērtību kārtās, kas novērota pie testējamās vielas un pozitīvās kontroles jebkuras koncentrācijas;

— $EC_{1,5}$ vērtību, kas apzīmē koncentrāciju, pie kuras iegūtā luciferāzes aktivitātes indukcija pārsniedz 1,5 kārtas sliekšņvērtību (t. i., par 50 % lielāka luciferāzes aktivitāte); un

— IC_{50} un IC_{30} koncentrācijas vērtības šūnu dzīvotspējas samazinājumam par 50 % un 30 %.

— Luciferāzes aktivitātes indukciju kārtās aprēķina, izmantojot 1. vienādojumu, savukārt vispārējo maksimālo indukciju kārtās (I_{max}) aprēķina kā vidējo vērtību no individuālajiem atkārtojumiem.

1. vienādojums:

$$Fold\ induction = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

kur:

L_{sample} ir luminiscences nolasījums testējamās ķimikālijas iedobē.

L_{blank} ir luminiscences nolasījums tukšajā iedobē, kurā nav šūnu un kura nav apstrādāta.

$L_{solvent}$ ir vidējais luminiscences nolasījums iedobēs, kuras satur šūnas un šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

$EC_{1,5}$ aprēķina, veicot lineāro interpolāciju saskaņā ar 2. vienādojumu, savukārt vispārējo $EC_{1,5}$ aprēķina kā individuālo atkārtojumu ģeometrisko vidējo.

2. vienādojums:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

kur:

C_a ir zemākā koncentrācija μM ar > 1,5-kārtīgu indukciju.

C_b ir augstākā koncentrācija μM ar < 1,5-kārtīgu indukciju.

I_a ir indukcija kārtās, mērīta pie zemākās koncentrācijas ar > 1,5-kārtīgu indukciju (trīs replikātu iedobju vidējais).

I_b ir indukcija kārtās, mērīta pie augstākās koncentrācijas ar < 1,5-kārtīgu indukciju (trīs replikātu iedobju vidējais).

Dzīvotspēju aprēķina, izmantojot 3. vienādojumu:

3. vienādojums:

$$Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

kur:

V_{sample} ir *MTT* absorbcijas nolasījums testējamās ķimikālijas iedobē.

V_{blank} ir *MTT* absorbcijas nolasījums tukšajā iedobē, kurā nav šūnu un kura nav apstrādāta.

$V_{solvent}$ ir vidējais *MTT* absorbcijas nolasījums iedobēs, kuras satur šūnas un šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

IC_{50} un IC_{30} aprēķina, veicot lineāro interpolāciju saskaņā ar 4. vienādojumu, savukārt vispārējo IC_{50} un IC_{30} aprēķina kā individuālo atkārtojumu ģeometrisko vidējo.

4. vienādojums:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

kur:

X ir procentuālais samazinājums pie aprēķināmās koncentrācijas (50 un 30 attiecīgi IC_{50} un IC_{30}).

C_a ir zemākā koncentrācija μM ar > x % dzīvotspējas samazinājumu.

C_a ir augstākā koncentrācija μM ar < x % dzīvotspējas samazinājumu.

V_a ir dzīvotspēja (%) pie zemākās koncentrācijas ar > x % dzīvotspējas samazinājumu.

V_b ir dzīvotspēja (%) pie augstākās koncentrācijas ar < x % dzīvotspējas samazinājumu.

Katrai koncentrācijai, kas uzrāda > 1,5-kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju, aprēķina statistisko nozīmīgumu (piem., izmantojot divpusēju Stjūdenta t-testu), trīs replikātu paraugu luminiscences vērtības salīdzinot ar šķīdinātāja (negatīvās) kontroles iedobju luminiscences vērtībām, lai noteiktu, vai luciferāzes aktivitātes indukcija ir statistiski nozīmīga ($p < 0,05$). Zemākā koncentrācija ar > 1,5-kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju ir vērtība, kas nosaka $EC_{1,5}$ vērtību. Pārbauda, vai katrā gadījumā šī vērtība ir zemāka par IC_{30} vērtību, kas norāda, ka pie $EC_{1,5}$ noteicošās koncentrācijas šūnu dzīvotspēja ir samazinājusies par mazāk nekā 30 %.

▼M7

Datus ieteicams vizuāli pārbaudīt ar diagrammu palīdzību. Ja nav novērojama skaidra devas–atbildreakcijas līkne vai iegūtā devas–atbildreakcijas līkne ir divfāzu (t. i., 1,5 sliekšņvērtību pārsniedz divreiz), eksperiments jāatkārto, lai noskaidrotu, vai to izraisījusi testējamās ķimikālijas specifika vai eksperimentāls artefakts. Ja neatkarīgā eksperimentā divfāzu atbildreakcija ir reproducējama, jāpaziņo zemākā $EC_{1,5}$ vērtība (koncentrācija, pie kuras sliekšņvērtība 1,5 tiek pārsniegta pirmo reizi).

Retajos gadījumos, kad tiek novērota statistiski nenozīmīga indukcija, kas pārsniedz 1,5 kārtas, kam seko statistiski nozīmīga indukcija pie augstākas koncentrācijas, rezultātus no šā atkārtojuma uzskata par derīgiem un pozitīviem vienīgi tad, ja statistiski nozīmīgā indukcija, kas pārsniedz sliekšņvērtību 1,5, iegūta pie koncentrācijas, kas nav citotoksiska.

Visbeidzot, testējamajām ķimikālijām, kuras jau pie zemākās testējamās koncentrācijas 0,98 μM rada 1,5-kārtīgu vai lielāku indukciju, $EC_{1,5}$ vērtību < 0,98 nosaka, balstoties uz devas–atbildreakcijas līknes vizuālu inspicēšanu.

Pieņemšanas kritēriji

Izmantojot *KeratinoSens*^{TM} testu, jābūt izpildītiem turpmāk norādītajiem pieņemšanas kritērijiem. Pirmkārt, ar pozitīvo kontroli, kanēļskābes aldehīdu, iegūtajai luciferāzes aktivitātes indukcijai vismaz vienā no testētajām koncentrācijām (no 4 līdz 64 μM) jābūt statistiski nozīmīgai, proti, jāpārsniedz sliekšņvērtība 1,5 (piem., izmantojot T-testu).

Otrkārt, $EC_{1,5}$ vērtībai jābūt divu standartnoviržu robežās no testējošās iestādes vēsturiskā vidējā (piem., no 7 μM līdz 30 μM, pamatojoties uz validācijas datu kopu), kas regulāri jāatjaunina. Turklāt trīs kanēļskābes aldehīda replikātos pie 64 μM vidējai indukcijai jābūt no 2 līdz 8. Ja pēdējais kritērijs nav izpildīts, atbildreakcija uz kanēļskābes aldehīda devu rūpīgi jāpārbauda un testus var akceptēt vienīgi tad, ja pozitīvajai kontrolei pie pieaugošas koncentrācijas viennozīmīgi novērojama atbildreakcija uz devu ar pieaugošu luciferāzes aktivitātes indukciju.

Visbeidzot, negatīvās (šķīdinātāja) kontroles *DMSO* vidējam luminiscences nolasījuma variācijas koeficientam katrā atkārtojumā, kas sastāv no 6 triplikātā testētām iedobēm, jābūt zem 20 %. Ja variācija ir lielāka, rezultāti nav derīgi.

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

KeratinoSens^{TM} prognozi uzskata par pozitīvu, ja 2 no 2 atkārtojumiem vai 2 no 3 atkārtojumiem ir izpildīti visi tālāk norādītie 4 nosacījumi; pretējā gadījumā *KeratinoSens*^{TM} prognozi uzskata par negatīvu (1. attēls):

1. I_{max} ir lielāks par (>) 1,5-kārtīgs un statistiskā nozīmīgumi atšķiras no atbilstošā rādītāja, kas iegūts šķīduma (negatīvajā) kontrolē (to nosaka ar divpusēju nesapārotu Stjūdenta t-testu);

2. šūnu dzīvotspēja pie zemākās koncentrācijas un ar vairāk nekā 1,5-kārtīgu luciferāzes aktivitātes indukciju (t. i., pie $EC_{1,5}$ noteicošās koncentrācijas) ir lielāka nekā (>) 70 %;

3. $EC_{1,5}$ vērtība ir zemāka par (<) 1 000 μM (vai < 200 μg/mL testējamajām ķimikālijām, kam nav noteiktas molekulmasas);

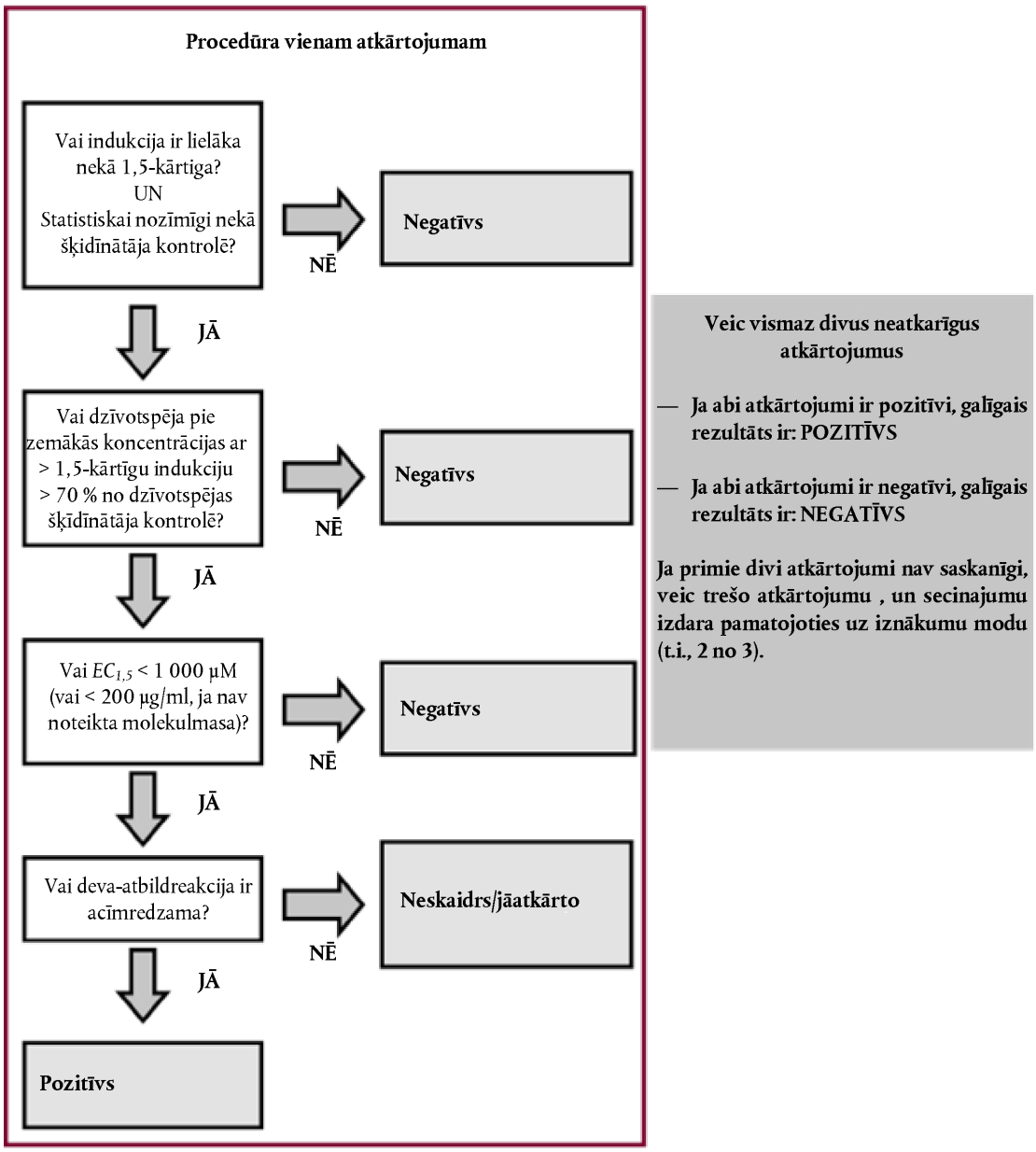
4. luciferāzes indukcijai ir acīmredzama vispārēja atbildreakcija uz devu (vai divfāzu atbildreakcija, kas minēta 33. punktā).

▼M7

Ja konkrētā atkārtojumā ir izpildīti visi trīs pirmie nosacījumi, taču luciferāzes indukcijai nav novērojama viennozīmīga atbildreakcija uz devu, attiecīgā atkārtojuma rezultāti jāuzskata par neskaidriem un var būt jāveic papildu testēšana (1. attēls). Turklāt arī negatīvs rezultāts, kas iegūts ar koncentrācijām < 1 000 µM (vai < 200 µg/mL testējamajām ķimikālijām, kam nav noteiktas molekulmasas), jāuzskata par neskaidru (sk. 11. punktu).

1. attēls

***KeratinoSens*™ testā izmantotais prognozes modelis. *KeratinoSens*™ prognoze jāskata *IATA* kontekstā un atbilstīgi 9. un 11. punkta noteikumiem.**



Retos gadījumos testējamās ķimikālijas, kuras luciferāzes aktivitāti inducē ļoti tuvu citotoksiskajiem līmeņiem, dažos atkārtojumos var būt pozitīvas tādos līmeņos, kas nav toksiski (t. i., $EC_{1,5}$ noteicošā koncentrācija mazāka par (<)

▼M7

IC_{30}), bet citos atkārtojumos — vienīgi citotoksiskos līmeņos (t. i., $EC_{1,5}$ noteicošā koncentrācija pārsniedz (>) IC_{30}). Tādas testējamās ķimikālijas jātestē atkārtoti, veicot vēl rūpīgāku devas–atbildreakcijas analīzi ar mazāku atšķaidījuma koeficientu (piem., 1,33 vai Ö2 (= 1,41) atšķaidījuma koeficients starp iedobēm), lai noteiktu, vai indukcija ir vai nav radusies citotoksiskos līmeņos (9).

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķimikālija

— Vienkomponenta viela:

  — ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO*, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

  — tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

  — apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

  — testētā(-s) koncentrācija(-s),

  — uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

  — ciktāl iespējams, raksturoti ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām,

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO* un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama,

  — molekulmasa vai šķietamā molekulmasa maisījumiem/polimēriem ar zināmu sastāvu vai cita pētījuma norisei relevanta informācija,

  — apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

  — testētā(-s) koncentrācija(-s),

  — uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Kontroles

— Pozitīvā kontrole:

  — ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati,

  — fiziskais izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība *DMSO*, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (un attiecīgā gadījumā),

  — tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

  — apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

  — testētā(-s) koncentrācija(-s),

  — uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,

▼M7

— norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā).

— Negatīvā (nesēja) kontrole:

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati,

— tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.,

— fiziskais izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības gadījumā, ja tiek veiktas citas negatīvās kontroles/izmantoti citi testēšanas metodē neminēti nesēji, ciktāl šī informācija ir pieejama,

— uzglabāšanas nosacījumi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama,

— katrai testējamai ķimikālijai izraudzītā šķīdinātāja pamatojums.

Testēšanas metodes izmantošanas apstākļi

— sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese;

— izmantotās testēšanas metodes apraksts;

— izmantotā šūnu līnija, tās uzglabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, kur tās ņemtas);

— testēšanā izmantoto šūnu pasāžu skaits un konfluences līmenis;

— šūnu skaitīšanas metode, kas izmantota uzsēšanai pirms testēšanas, un pasākumi, kas veikti, lai nodrošinātu šūnu skaita viendabīgu sadali (sk. 20. punktu);

— izmantotais luminometrs (piem., modelis), tostarp instrumentu iestatījumi, izmantotais luciferāzes substrāts un pienācīgu luminiscences mērījumu pierādīšana ar 3. papildinājumā aprakstīto kontroltestu;

— procedūra, ar kuru pierādīta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes veiktspējas reproducējamība ilgākā laikā.

Testa procedūra

— izmantoto atkārtojumu un replikātu skaits;

— izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšanas procedūras un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētajiem);

— izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts;

— izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts;

— testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

Rezultāti

— tabulā apkopotas I_{max}, $EC_{1,5}$ un dzīvotspējas vērtības (piem., IC_{50}, IC_{30}), kas iegūtas katrā testējamās ķimikālijas un pozitīvās kontroles atkārtojumā, kā arī vidējās vērtības (I_{max}: vidējā; $EC_{1,5}$ un dzīvotspējas vērtības: vidējais ģeometriskais) un SN, kas aprēķināta, izmantojot datus no visiem individuālajiem atkārtojumiem, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli;

▼M7

— variācijas koeficients, kas ar luminiscences nolasījumiem iegūts par katra eksperimenta negatīvo kontroli;

— grafiks, kurā attēlotas devas–atbildreakcijas līknes attiecībā uz luciferāzes aktivitātes indukciju un dzīvotspēju;

— jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums

— ar *KeratinoSens*^{TM} testu iegūto rezultātu iztirzājums,

— ar testēšanas metodi iegūto rezultātu iztirzājums *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija.

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Pieejams: 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 Environment, Health and Safety publications, 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) Šā pielikuma B.42. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests".

(5) Šā pielikuma B.6. nodaļa "Ādas sensibilizācija".

(6) Šā pielikuma B.50. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: *DA*".

(7) Šā pielikuma B.51. nodaļa "Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: *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) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Pieejams: 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. Pieejams: 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 potentials. 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. Dermatol., 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 N0 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.34. 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (29).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš)**: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* rezultātam (2).

ARE: antioksidanta atbildreakcijas elements (saukts arī par *EpRE* jeb elektrofila atbildreakcijas elementu) ir daudzos citoprotektīvu un II fāzes gēnu augšupējos promoteru reģionos atrodams atbildreakcijas elements. Kad tas tiek aktivizēts ar *Nrf2*, tas darbojas kā starpnieks šo gēnu transkripcionālajā indukcijā.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Variācijas koeficients: mainības mērs, ko aprēķina replikātu datu grupai, standartnovirzi izdalot ar vidējo vērtību. Lai to izteiktu procentos, to reizina ar 100.

$EC_{1,5}$: interpolēta koncentrācija 1,5-kārtīgai luciferāzes indukcijai.

IC_{30}: koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās par 30 %.

IC_{50}: koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja samazinās par 50 %.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja)**: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku konkrētu un līdz ar to minimālu testēšanu.

I_{max}: maksimālais luciferāzes aktivitātes indukcijas koeficients pie jebkuras testējamās ķimikālijas koncentrācijas salīdzinājumā ar šķīdinātāja (negatīvo) kontroli.

Keap1: *Kelch* tipa ar *ECH* asociētais proteīns 1 ir sensorais proteīns, kas var regulēt *Nrf2* aktivitāti. Neinducētos apstākļos sensorais proteīns *Keap1* iedarbojas uz *Nrf2* transkripcijas faktoru, to ubikvitinējot un proteolītiski degradējot proteosomā. *Keap 1* reaktīvo cisteīna atlieku kovalenta modificēšana ar nelielām molekulām var izraisīt *Nrf2* disociāciju no *Keap1* (8) (10) (11).

▼M7

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kuras tajā savstarpēji nereaģē (1).

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masas).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masas) un < 80 % (masas). Daudzkomponentu vielas tiek saražotas. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

Nrf2: *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* ir antioksidanta atbildreakcijas ceļā iesaistīts transkripcijas faktors. Ja *Nrf2* netiek ubikvitinēts, tas uzkrājas citoplazmā un translocējas uz kodolu, kur tas daudzu citoprotektīvu gēnu augšējā promotera reģionā kombinējas ar *ARE*, iniciējot to transkripciju (8) (10) (11).

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (29).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā (29).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķimikāliju (sk. "Ticamība") (29).

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (29).

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (29).

Viela: dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu (1).

Testējamā ķimikālija: terminu "testējamā ķimikālija" izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts.

▼M7

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO *GHS*): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

UVCB: viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (29).

▼M7

2. papildinājums

STANDARTVIELAS

***In vitro* ādas sensibilizācija: *ARE-Nrf2* luciferāzes testēšanas metode**

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot *KeratinoSens*™ prognozi 1. tabulā ieteiktajām 10 standartvielām un vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot $EC_{1,5}$ un IC_{50} vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Šīs standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsauces datu pieejamība un kvalitatīvu ar *KeratinoSens*™ testu iegūtu datu pieejamība.

1. tabula

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot *KeratinoSens*™ testu

Standartvielas	*CAS* Nr.	Agregātstāvoklis	*In vivo* prognoze (1)	KeratinoSens™ Prognoze (2)	$EC_{1,5}$ (μM) atsauces diapazons (3)	IC_{50} (μM) atsauces diapazons (3)
Izopropanols	67-63-0	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Salicilskābe	69-72-7	Cieta viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Pienskābe	50-21-5	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Glicerīns	56-81-5	Šķidra viela	Nav sensibilizators	Negatīva	> 1 000	> 1 000
Cinamilspirts	104-54-1	Cieta viela	Sensibilizators (vājš)	Pozitīva	25–175	> 1 000
Etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	Šķidra viela	Sensibilizators (vājš)	Pozitīva	5–125	> 500
2-Merkaptobenzotiazols	149-30-4	Cieta viela	Sensibilizators (vidējs)	Pozitīva	25–250	> 500
Metildibromglutaronitrils	35691-65-7	Cieta viela	Sensibilizators (stiprs)	Pozitīva	< 20	20–100
4-metilaminofenola sulfāts	55-55-0	Cieta viela	Sensibilizators (stiprs)	Pozitīva	< 12,5	20–200
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	Cieta viela	Sensibilizators (ļoti stiprs)	Pozitīva	< 12,5	5–20

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognozes ir balstītas uz *LLNA* datiem (13). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot ECETOC ierosinātos kritērijus (24).
(2) KeratinoSensTM prognoze jāskata IATA kontekstā un atbilstīgi šīs testēšanas metodes 9. un 11. punkta noteikumiem.
(3) Pamatojoties uz vēsturiskajiem novērojumu datiem (12).

▼M7

3. papildinājums

LUMINISCENCES MĒRĪJUMU KVALITĀTES KONTROLE

Pamateksperiments optimālu luminiscences mērījumu nodrošināšanai *KeratinoSens*^{TM} testā

Lai ar luminometru iegūtu ticamus rezultātus, būtiski ir šādi trīs parametri:

— pietiekama jutība, kas kontroliedobēs ļauj iegūt stabilus fona rādītājus;

— platē nav gradienta ilga nolasīšanas laika dēļ; un

— iedobes, kuras atrodas blakus ļoti aktīvām iedobēm, nav kontaminētas ar gaismu.

Pirms testēšanas ieteicams pārliecināties, ka luminiscences mērījumi ir pienācīgi, testējot kontrolplati, kas sagatavota šādi (analīze triplikātā).

Plates sagatavošana pirmajam treniņeksperimentam

	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**	**Tukša**

EGDMA = etilēnglikola dimetakrilāts (*CAS* Nr. 97-90-5), spēcīga inducētājķimikālija.

CA = kanēļskābes aldehīds, pozitīvā standartviela (*CAS* Nr. 104-55-2).

Kvalitātes kontroles analīzei jāuzrāda:

— skaidra atbildreakcija uz devu D rindā, ar I_{max} > 20-kārtīgi virs fona vērtībām (vairumā gadījumu tiek sasniegtas I_{max} vērtības no 100 līdz 300);

— nekāda atbildreakcija uz devu C un E rindā (indukcijas vērtība nepārsniedz 1,5 (ideālā gadījumā — nepārsniedz 1,3), ko būtu radījusi iespējama kontaminācija ar gaismu no ļoti aktīvajām iedobēm *EGDMA* rindā;

— starp rindām A, B, C, E, F un G nav statistiski nozīmīgas atšķirības (t. i., platē nav gradienta); un

— mainībai rindās A, B, C, E, F un G un *DMSO* iedobēs rindā H jābūt zem 20 % (t. i., stabils fons).

▼M7

B.61. FLUORESCEĪNA CAURPLŪDES TESTĒŠANAS METODE ACU KOROZIJAS VAI NOPIETNA KAIRINĀJUMA IZRAISĪTĀJU IDENTIFICĒŠANAI

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 460 (2012). Fluoresceīna caurplūdes (*FL*) testēšanas metode ir *in vitro* testēšanas metode, kas konkrētos apstākļos un ar konkrētiem ierobežojumiem izmantojama tādu ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasificēšanai, kuras izraisa acu koroziju un nopietnu kairinājumu, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1. kategorija), Regulā (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]) (1. kategorija) un saskaņā ar ASV Vides aizsardzības aģentūru (*EPA*) (I kategorija) (1) (2). Šajā testēšanas metodē nopietna acu kairinājuma izraisītāji ir ķimikālijas, kuras pēc ievadīšanas izraisa tādus acs audu bojājumus, kas 21 dienas laikā nav atgriezeniski vai izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos, savukārt acu korozijas izraisītāji ir ķimikālijas, kas rada neatgriezeniskus acs audu bojājumus. Šīs ķimikālijas klasificē ANO *GHS* 1. kategorijā, ES *CLP* 1. kategorijā vai ASV *EPA* I kategorijā.

Kaut arī *FL* testēšanas metodi neuzskata par derīgu kā trušu acu *in vivo* testa pilnīgu aizstājēju, to ieteicams izmantot kā daļu no daudzpakāpju testēšanas stratēģijas klasificēšanas un marķēšanas normatīvajiem mērķiem. Līdz ar to *FL* ieteicams izmantot par sākotnējo soli lejupējā pieejā, lai identificētu acu korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājus, testējot konkrētu veidu ķimikālijas (t. i., ūdenī šķīstošas vielas un maisījumus) (3) (4).

Šobrīd ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviens atsevišķs *in vitro* acu kairinājuma tests nevarēs aizstāt *in vivo* acu testu (TM B.5 (5)) un prognozēt visus kairinājuma veidus dažādām ķimikāliju klasēm. Tomēr *in vivo* acu testu varētu būt iespējams aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski apvienojot vairākas alternatīvas testēšanas metodes (4). Lejupējā pieeja (4) ir izstrādāta izmantošanai gadījumos, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķimikālijai ir paredzams augsts kairinājuma izraisīšanas potenciāls.

Pamatojoties uz 35. punktā izklāstīto prognozes modeli, ar *FL* testēšanas metodi ierobežotas pielietojamības jomā, neveicot tālāku testēšanu, iespējams identificēt ķimikālijas, kas ir acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājas (ANO *GHS* 1. kategorija, ES *CLP* 1. kategorija vai ASV *EPA* I kategorija). To pašu pieņem attiecībā uz maisījumiem, kaut arī maisījumi validācijā netika izmantoti. Tāpēc *FL* testēšanas metodi var izmantot, lai noteiktu ķimikāliju spēju izraisīt acu kairinājumu/koroziju, izmantojot tālāko TM B.5. secīgās testēšanas stratēģiju (5). Tomēr ķimikālija, kas ar *FL* testēšanas metodi nav prognozēta kā acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāja, jātestē ar vienu vai vairākām papildu

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).

▼M7

testēšanas metodēm (*in vitro* un/vai *in vivo*), ar kurām ir iespējams precīzi identificēt i) ķimikālijas, kuras *FL* testēšanas metodē ir *in vitro* pseidonegatīvas acu koroziju / nopietnu kairinājumu izraisītājas vielas (ANO *GHS* 1. kategorija, ES *CLP* 1. kategorija, ASV *EPA* I kategorija); ii) ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu korozijas/kairinājuma izraisītājas (ANO *GHS* nekategorizētas ķimikālijas, ES *CLP* nekategorizētas ķimikālijas, ASV *EPA* IV kategorija), un/vai iii) ķimikālijas, kuras ir vidēji/viegli kairinošas acīm (ANO *GHS* 2.A un 2.B kategorija, ES *CLP* 2. kategorija, ASV *EPA* II un III kategorija).

Šīs testēšanas metodes mērķis ir aprakstīt procedūras, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķimikālijas potenciālu izraisīt acu koroziju vai nopietnu kairinājumu, ko mēra ar tās spēju radīt bojājumus necaurlaidīgā konfluentā epitēlija monoslānī. Pienācīga transepiteliālā caurlaidība ir būtiska epitēlija — arī konjunktīvas un radzenes epitēlija — funkcija. Transepiteliālo caurlaidību kontrolē dažādi blīvie savienojumi. Ir pierādīts, ka, palielinoties acs kairinājumam, radzenes epitēlija *in vivo* caurlaidības palielinājums korelē ar novēroto iekaisuma un virsmas bojājuma pakāpi.

FL testēšanas metodē toksisko ietekmi pēc īslaicīgas ekspozīcijas testējamai ķimikālijai mēra pēc epitēlija monoslāņa nātrija fluoresceīna caurlaidības palielināšanās Madina–Dārbija suņu nieru (*Madin-Darby Canine Kidney*, *MDCK*) šūnās, kas kultivētas uz caurlaidīgiem insertiem. Fluoresceīna caurplūdes apjoms ir proporcionāls bojājumiem, kas ķīmiski inducēti blīvajos savienojumos, desmosomālajos savienojumos un šūnu membrānās, un to var izmantot, lai aplēstu testējamās ķimikālijas potenciālu atstāt toksisku ietekmi uz aci. 1. papildinājumā sniegta diagramma, kurā attēlotas *MDCK* šūnas, ko *FL* testēšanas metodes vajadzībām audzē uz inserta membrānas.

Definīcijas ir sniegtas 2. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Šī testēšanas metode ir balstīta uz *INVITTOX* protokolu Nr. 71 (6), ko starptautiskā validācijas pētījumā izvērtējis Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (*ECVAM*) sadarbībā ar ASV Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteju (*ICCVAM*) un Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*JaCVAM*).

FL testēšanas metodi ieteicams izmantot tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras klasificējamas kā viegli/vidēji kairinātāji, vai ķimikālijām, kuras nav klasificējamas kā acu kairinātāji (vielas un maisījumi) (t. i., *GHS* 2.A/2.B kat., nekategorizētas ķimikālijas; ES *CLP* 2. kat., nekategorizētas ķimikālijas; ASV *EPA* II/III/IV kat.), kā konstatēts validācijas pētījumā (3) (7).

Šī testēšanas metode izmantojama vienīgi ūdenī šķīstošām ķimikālijām (vielām un maisījumiem). Ar *FL* testēšanas metodi parasti precīzi prognozē tādu ķimikāliju potenciālu izraisīt spēcīgu acu kairinājumu, kuras šķīst ūdenī un kuru toksisko ietekmi atšķaidīšana neietekmē (7). Lai ķimikāliju kategorizētu kā ūdenī šķīstošu, eksperimenta apstākļos tai jāšķīst sterilā kalciju saturošā (pie koncentrācijas 1,0–1,8 mM), fenolsarkano nesaturošā Henksa līdzsvarotajā sāļu šķīdumā (*HBSS*) pie koncentrācijas $\geq$ 250 mg/ml (viena deva virs 100 mg/ml robežas). Tomēr, ja testējamā ķimikālija šķīst pie koncentrācijas, kas ir zemāka par 100 mg/ml, un pie minētās koncentrācijas jau izraisa *FL* 20 % indukciju (proti, FL_{20} < 100 mg/ml), to tik un tā var klasificēt *GHS* 1. kategorijā vai *EPA* I kategorijā.

Šai testēšanas metodei konstatētie ierobežojumi no tās pielietojamības jomas izslēdz spēcīgas skābes un bāzes, šūnu fiksatorus un ļoti gaistošas ķimikālijas. Šīm ķimikālijām ir raksturīgi mehānismi, kurus ar *FL* testēšanas metodi nemēra, piem., ekstensīva koagulācija, pārziepošanās vai specifiskas ķīmiskās reakcijas. Citi šai metodei konstatētie ierobežojumi ir balstīti uz spēju izdarīt prognozes par

▼M7

iekrāsotām un viskozām testējamajām ķimikālijām (7). Pieejamā informācija liecina, ka abu veidu ķimikālijas pēc īsā ekspozīcijas perioda ir grūti noņemt no monoslāņa un ka šīs testēšanas metodes prognozētspēju varētu uzlabot, ja tiktu izmantots lielāks skaits skalošanas posmu. Šķidrumā suspendētām cietām ķimikālijām ir tendence izgulsnēties, un var būt grūti noteikt to galīgo koncentrāciju šūnās. Ja no datubāzes izslēdz ķimikālijas, kas ietilpst šajās ķīmisko un fizikālo īpašību klasēs, *FL* pareizība ES, *EPA* un *GHS* klasifikācijas sistēmās ievērojami uzlabojas (7).

Ņemot vērā šīs testēšanas metodes mērķi (t. i., identificēt vienīgi acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājus), pseidonegatīvo rezultātu īpatsvaram (sk. 13. punktu) nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu secīgas testēšanas stratēģijā, visas šādas ķimikālijas pēc tam tiktu testētas ar citiem pienācīgi validētu(-iem) *in vitro* testu(-iem) vai ar trušiem — atkarībā no normatīvajām prasībām (5) (sk. arī 3. un 4. punktu).

Citi konstatētie *FL* testēšanas metodes ierobežojumi ir balstīti uz pseidonegatīvo un pseidopozitīvo rezultātu īpatsvaru. Kad to izmantoja par sākotnējo soli lejupējā pieejā, lai identificētu ūdenī šķīstošas acu korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājas vielas un maisījumus (ANO *GHS* 1. kategorija; ES *CLP* 1. kategorija; ASV *EPA* I kategorija), *FL* testēšanas metodes pseidopozitīvo rezultātu īpatsvars svārstījās diapazonā no 7 % (7/103; ANO *GHS* un ES *CLP*) līdz 9 % (9/99; ASV *EPA*) un pseidonegatīvo rezultātu īpatsvars svārstījās diapazonā no 54 % (15/28; ASV *EPA*) līdz 56 % (27/48; ANO *GHS* un ES *CLP*), salīdzinot ar *in vivo* rezultātiem. Šajā dokumentā nav noteikts, kādas ķimikāliju grupas *FL* testēšanas metodē uzrāda pseidopozitīvus un/vai pseidonegatīvus rezultātus.

Uz *MDCK* šūnu kultūru attiecas īpaši tehniskie ierobežojumi. Blīvie savienojumi, kas bloķē fluoresceīna sāls krāsvielas izsūkšanos cauri monoslānim, pieaugot šūnu pasāžu skaitam, funkcionē aizvien sliktāk. Nepilnīga blīvo savienojumu izveidošanās neapstrādātajā kontrolē palielina *FL*. Tādēļ ir svarīgi noteikt pieļaujamo maksimālo caurplūdi neapstrādātajās kontrolēs (sk. 38. punktu par 0 % caurplūdi). Tāpat kā visos *in vitro* testos, šūnas laika gaitā var transformēties, tāpēc ir būtiski testiem noteikt pasāžu skaita diapazonus.

Dažos gadījumos pašreizējo pielietojamības jomu var paplašināt, taču tikai pēc tam, kad izanalizēta pētīto testējamo ķimikāliju paplašināta datu kopa, vēlams, iegūta testēšanā (3). Šo testēšanas metodi pienācīgi atjaunina, ņemot vērā jaunu informāciju un datus.

Laboratorijām, kas sāk lietot šo testēšanas metodi, jāizmanto 3. papildinājumā norādītās standartķimikālijas. Laboratorija šīs ķimikālijas var izmantot *FL* testēšanas metodes izmantošanas tehniskās kompetences demonstrēšanai pirms *FL* testēšanas rezultātu datu iesniegšanas izmantošanai normatīvajos aktos reglamentētajai bīstamības klasifikācijai.

TESTA PRINCIPS

FL testēšanas metode ir uz citotoksicitāti un šūnu funkciju balstīts *in vitro* tests, ko veic ar *MDCK CB997* kanāliņu epitēlija šūnu konfluentu monoslāni, audzētu uz puscaurlaidīgiem insertiem, un kas modelē *in vivo* radzenes epitēlija fāzi, kurā šūnas nevairojas. *MDCK* šūnu līnija ir labi zināma un veido blīvos un desmosomālos savienojumus, kas līdzinās tiem, kuri atrodas konjunktīvas un radzenes apikālajā pusē. Blīvie un desmosomālie *in vivo* savienojumi neļauj radzenes epitēlijā iespiesties šķīdinātajām ķimikālijām un svešiem materiāliem. Blīvo un desmosomālo savienojumu bojājumu izraisīts transepiteliālās necaurlaidības zudums ir viens no agrīnajiem notikumiem ķīmiski inducētā acu kairinājumā.

▼M7

Testējamo ķimikāliju aplicē uz inserta apikālajā pusē audzētu šūnu konfluentā slāņa. Regulāri izmanto īsu — 1 min — ekspozīcijas laiku, lai atspoguļotu normālo klīrensa ātrumu cilvēka ekspozīcijas gadījumā. Īsā ekspozīcijas laika priekšrocība ir tāda, ka vielas un maisījumus uz ūdens bāzes var testēt neatšķaidītus, ja tos pēc ekspozīcijas perioda var viegli noņemt. Tas ļauj rezultātus tiešāk salīdzināt ar ķīmisko ietekmi uz cilvēkiem. Pēc tam testējamo ķimikāliju novāc un uz 30 minūtēm monoslāņa apikālajai pusei pievieno netoksisku, ļoti fluorescējošu nātrija fluoresceīna krāsvielu. Bojājumus, ko testējamā ķimikālija radījusi blīvajiem savienojumiem, nosaka pēc fluoresceīna daudzuma, kas noteiktā laika periodā izplūst cauri šūnu slānim.

Nātrija fluoresceīna krāsvielas daudzumu, kas izplūst cauri monoslānim un inserta membrānai un ieplūst iedobē esošajā noteiktajā šķīduma daudzumā (kurā ieplūst nātrija fluoresceīna krāsviela), nosaka, iedobē spektrofluorimetriski izmērot fluoresceīna koncentrāciju. Fluoresceīna caurplūdes (*FL*) daudzumu aprēķina, ņemot vērā fluorescences intensitātes (FI) nolasījumus no divām kontrolēm: tukšās kontroles un maksimālās caurplūdes kontroles. Pie katras no testējamai ķimikālijai noteiktajām koncentrācijām izsaka caurplūdes procentuālo daudzumu un līdz ar to blīvajos savienojumu bojājumu apjomu attiecībā pret šīm kontrolēm. Aprēķina FL_{20} (t. i., koncentrāciju, kas izraisa 20 % *FL*, salīdzinājumā ar vērtību, kas reģistrēta neapstrādātam konfluentam monoslānim un insertiem, kuros nav šūnu). Prognozes modelī, ar ko identificē acu korozijas un nopietna kairinājuma izraisītājus, izmanto FL_{20} (mg/ml) vērtību (sk. 35. punktu).

Svarīga testējamās ķimikālijas toksicitātes profila daļa, ko novērtē arī acu kairinājuma *in vivo* testā, ir rekuperācija. Sākotnējo analīžu dati liecina, ka dati par rekuperāciju (līdz 72 h pēc eksponētības ķimikālijai), iespējams, varētu palielināt *INVITTOX* protokola Nr. 71 prognozētspēju, bet ir nepieciešama turpmāka izvērtēšana un papildu dati, vēlams, no papildu testiem (6). Šo testēšanas metodi pienācīgi atjaunina, ņemot vērā jaunu informāciju un datus.

PROCEDŪRA

Šūnu monoslāņa sagatavošana

MDCK CB997 šūnu monoslāni sagatavo, izmantojot subkonfluentas šūnas, ko audzē šūnu kultivēšanas kolbās *DMEM*/uzturvielu maisījumā F12 (1x koncentrāts ar L-glutamīnu, 15 mM *HEPES*, kalciju (koncentrācijā 1,0–1,8 mM) un 10 % termiski aktivētu *FCS/FBS*). Svarīgi: visām *FL* testā izmantotajām barotnēm/šķīdumiem jāsatur kalcijs koncentrācijā no 1,8 nM (200 mg/l) līdz 1,0 mM (111 mg/l), lai nodrošinātu blīvā savienojuma veidošanos un integritāti. Lai nodrošinātu vienādu un reproducējamu blīvo savienojumu veidošanos, jākontrolē šūnu pasāžu skaita diapazons. Vēlamais šūnu pasāžu diapazons pēc atkausēšanas ir 3–30, jo šūnām šajā pasāžu diapazonā ir līdzīga funkcionētspēja, un tas palīdz iegūt reproducējamus testa rezultātus.

Pirms *FL* testēšanas metodes izpildes šūnas atdala no kolbas tripsinizējot, centrifugē un pienācīgā daudzumā uzsēj 24 iedobju plates insertos (sk. 1. papildinājumu). Šūnu uzsēšanai izmanto 12 mm diametra insertus ar jauktu celulozes esteru membrānu ar biezumu 80–150 μm un poru lielumu 0,45 μm. Validācijas pētījumā tika izmantoti *Millicell-HA* 12 mm inserti. Svarīgas ir inserta un membrānas tipa īpašības, jo tās var ietekmēt šūnu augšanu un ķīmisko saistīšanos. Atsevišķu tipu ķimikālijas var saistīties ar *Millicell-HA* inserta membrānu, kas var ietekmēt rezultātu interpretāciju. Ja tiek izmantotas citas membrānas, to līdzvērtīgums jādemonstrē ar standartķimikālijām (sk. 3. papildinājumu).

▼M7

Ķīmiskā saistīšanās ar inserta membrānu ir izplatītāka katjoniskām ķimikālijām, piem., benzalkonija hlorīdam, ko piesaista pozitīvi uzlādētā membrāna (7). Ķīmiskā saistīšanās ar inserta membrānu var palielināt ķimikālijas ekspozīcijas laiku, kā rezultātā ķimikālijas toksiskuma potenciāls var tikt novērtēts pārāk augstu, bet var arī fiziski samazināt fluoresceīna caurplūdi caur insertu, krāsvielai saistoties ar katjonisko ķimikāliju, kas saistījusies ar inserta membrānu, kā rezultātā ķimikālijas toksiskuma potenciāls var tikt novērtēts pārāk zemu. To iespējams viegli uzraudzīt, atsevišķu membrānu eksponējot testējamās ķimikālijas maksimālajai koncentrācijai un pēc tam uz standarta laiku (bez šūnu kontroles) pievienojot nātrija fluoresceīna krāsvielu normālā koncentrācijā. Ja novērojama nātrija fluoresceīna krāsvielas saistīšanās, inserta membrāna pēc testējamā materiāla noskalošanas izskatās dzeltena. Tāpēc, lai būtu iespējams interpretēt ķimikālijas ietekmi uz šūnām, ir būtiski zināt testējamās ķimikālijas saistīšanās īpašības.

Pēc šūnu uzsēšanas uz insertiem ķimikālijas ekspozīcijas laikā jābūt konfluentam monoslānim. Katrai iedobei jāpievieno $1,6 \times 10^5$ šūnas (400 µl šūnu suspensijas ar blīvumu 4×10^5 šūnu/ml). Šādos apstākļos konfluentu monoslāni parasti iegūst pēc 96 stundām kultūrā. Inserti pirms izsēšanas vizuāli jāanalizē, lai nodrošinātu, ka jebkādi bojājumi, ko reģistrē 30. punktā aprakstītajā vizuālajā kontrolē, radušies manipulāciju dēļ.

MDCK šūnu kultūras jāglabā inkubatoros mitrinātā atmosfērā pie 5 % ± 1 % CO_2 un 37 ± 1 °C. Šūnas nedrīkst būt kontaminētas ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm.

Testējamo un kontroles ķimikāliju aplicēšana

Katrā eksperimenta reizē jāsagatavo svaigs testējamās ķimikālijas izejšķīdums, kas jāizmanto 30 minūšu laikā pēc sagatavošanas. Testējamās ķimikālijas jāsagatavo kalciju saturošā (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošā *HBSS*, lai novērstu seruma proteīnu saistīšanos. Pirms testēšanas jānovērtē ķimikālijas šķīdība 250 mg/ml *HBSS*. Ja ķimikālija šajā koncentrācijā 30 minūtes veido stabilu suspensiju vai emulsiju (t. i., saglabā viendabīgumu un nenosēžas vai nesadalās vairākās fāzēs), *HBSS* var izmantot par šķīdinātāju. Taču, ja tiek konstatēts, ka ķimikālija pie šīs koncentrācijas *HBSS* nešķīst, jāapsver iespēja izmantot citu testēšanas metodi, nevis *FL*. Iespēju gadījumos, kad tiek konstatēts, ka ķimikālija nešķīst *HBSS*, par šķīdinātāju izmantot vieglu minerāleļļu, jāapsver piesardzīgi, jo nav pieejami pietiekami dati, lai izdarītu secinājumus par *FL* veiktspēju tādos apstākļos.

Visas testējamās ķimikālijas sagatavo no izejšķīduma sterilā, kalciju saturošā (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošā *HBSS* piecās fiksētās koncentrācijās, kas atšķaidītas pēc masas daļas: 1, 25, 100, 250 mg/ml un neatšķaidīts vai piesātināts šķīdums. Testējot cietu ķimikāliju, jāiekļauj ļoti liela koncentrācija — 750 mg/ml. Šīs koncentrācijas ķimikālija šūnām var būt jāaplicē, izmantojot pozitīvās izspiedes pipeti. Ja konstatētais toksiskums ir 25–100 mg/ml robežās, divreiz jātestē šādas papildu koncentrācijas: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. No šīm koncentrācijām aprēķina FL_{20} vērtību, ar noteikumu, ka ir izpildīti pieņemamības kritēriji.

Testējamās ķimikālijas aplicē konfluentajiem šūnu monoslāņiem pēc šūnu barotnes novākšanas un divreizējas noskalošanas ar sterilu, siltu (37 °C), kalciju saturošu (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošu *HBSS*. Pirms tam filtrus vizuāli pārbaudīta uz jebkādiem iepriekšējiem bojājumiem, ko varētu kļūdaini piedēvēt potenciālam nesaderīgumam ar testējamām ķimikālijām. Katrai

▼M7

testējamās ķimikālijas koncentrācijai un kontrolēm katrā izpildē jāizmanto vismaz trīs replikāti. Pēc 1 min ekspozīcijas istabas temperatūrā testējamā ķimikālija piesardzīgi jānoņem ar atsūkšanas metodi, monoslānis divreiz jānoskalo ar sterilu, siltu (37 °C), kalciju saturošu (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošu *HBSS* un nekavējoties jāizmēra fluoresceīna caurplūde.

Katrā testēšanas reizē jāizmanto paralēlas negatīvās kontroles (NK) un pozitīvās kontroles (PK), lai uzskatāmi parādītu, ka monoslāņa integritāte (NK) un šūnu jutība (PK) ir iepriekš noteiktajā vēsturiskajā pieņemamības diapazonā. Ieteicamā PK ķimikālija ir *Brij 35* (*CAS* Nr. 9002-92-0) pie 100 mg/ml. Pie šādas koncentrācijas būtu jārodas aptuveni 30 % fluoresceīna caurplūdes (pieņemamais fluoresceīna caurplūdes, t. i., šūnu slāņa bojājumu, diapazons ir 20–40 %). Ieteicamā NK ķimikālija ir kalciju saturošs (1,0–1,8 mM koncentrācijā), fenolsarkano nesaturošs *HBSS* (neapstrādāta, tukša kontrole). Katrā testēšanas reizē jāiekļauj arī maksimālās caurplūdes kontrole, lai būtu iespējams aprēķināt FL_{20} vērtības. Maksimālo caurplūdi nosaka, izmantojot kontroles insertu, kurā nav šūnu.

Fluoresceīna caurlaidības noteikšana

Tūlīt pēc testējamo un kontroles ķimikāliju novākšanas insertiem (piem., *Millicell-HA*) pievieno 400 µl 0,1 mg/ml nātrija fluoresceīna šķīduma (0,01 % (masas) kalciju saturošs [1,0–1,8 mM koncentrācijā], fenolsarkano nesaturošs *HBSS*). Kultūras 30 minūtes tur istabas temperatūrā. Pēc inkubēšanas ar fluoresceīnu insertus no katras iedobes piesardzīgi izņem. Katru filtru vizuāli pārbauda un reģistrē visus bojājumus, kas radušies manipulāciju laikā.

Caur monoslāni un insertu caurplūdušā fluoresceīna daudzumu šķīdumā, kas palicis iedobēs pēc insertu izņemšanas, izsaka skaitliski. Spektrofluorimetrā veic mērījumus ar ierosas un emisijas viļņa garumiem, attiecīgi 485 nm un 530 nm. Spektrofluorimetra jutībai jābūt noregulētai tā, lai panāktu vislielāko skaitlisko atšķirību starp maksimālo *FL* (inserts bez šūnām) un minimālo *FL* (inserts ar konfluento monoslāni, kas apstrādāts ar NK). Tā kā izmantotie spektrofluorimetri atšķiras, ieteicams izmantot jutību, kas pie maksimālās fluoresceīna caurplūdes kontroles sniedz fluorescences intensitāti > 4 000. Maksimālā *FL* vērtība nedrīkst pārsniegt 9999. Maksimālās fluorescences caurplūdes intensitātei jāietilpst izmantotā spektrofluorimetra lineārajā diapazonā.

Rezultātu interpretēšana un prognozes modelis

FL daudzums ir proporcionāls ķimikālijas inducētajiem blīvo savienojumu bojājumiem. Katras ķimikālijas testētās koncentrācijas *FL* procentuālo daudzumu aprēķina no *FL* vērtībām, kas iegūtas par testējamo ķimikāliju, ņemot vērā *FL* vērtības no NK (nolasījums no šūnu konfluentā monoslāņa, kas apstrādāts ar NK) un maksimālās caurplūdes kontroli (*FL* apjoma nolasījums cauri insertam, kurā nav šūnu).

Maksimālās caurplūdes fluorescences vidējā intensitāte = x.

0 % caurplūdes fluorescences vidējā intensitāte (NK) = y.

Vidējo 100 % caurplūdi iegūst, no vidējās maksimālās caurplūdes atņemot vidējo 0 % caurplūdi,

t. i., x – y = z.

Caurplūdes procentuālo daudzumu pie katras fiksētās devas iegūst, no trīs replikātu nolasījumu fluorescences vidējās intensitātes (m) atņemot 0 % caurplūdi un šo vērtību izdalot ar 100 % noplūdi, t. i., % FL = [(m-y) / z] x 100 %, kur:

▼M7

m = trīs replikātu mērījumu fluorescences vidējā intensitāte izmantotajai koncentrācijai;

% FL = šūnu slānim caurplūdušā fluoresceīna procentuālais daudzums.

Lai aprēķinātu, kāda ķimikālijas koncentrācija izraisa 20 % *FL*, jāizmanto šāds vienādojums:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

kur:

D = inhibēšana (%)

A = bojājums (%) (20 % fluoresceīna caurplūde)

B = fluoresceīna caurplūde (%) < A

C = fluoresceīna caurplūde (%) > A

M_C = C koncentrācija (mg/ml)

M_B = B koncentrācija (mg/ml)

Tālāk sniegta FL_{20} robežvērtība prognozēm, ka ķimikālija izraisa acu koroziju / nopietnu kairinājumu:

FL_{20} (mg/ml)	K&M saskaņā ar ANO *GHS*	K&M saskaņā ar ES *CLP*	K&M saskaņā ar ASV *EPA*
≤ 100	1. kategorija	1. kategorija	I kategorija

K&M: klasificēšana un marķēšana

FL testēšanas metodi ieteicams izmantot tikai ūdenī šķīstošu acu korozijas un nopietnu kairinājumu izraisītāju identificēšanai (ANO *GHS* 1. kategorija, ES *CLP* 1. kategorija, ASV *EPA* I kategorija) (sk. 1. un 10. punktu).

Lai ūdenī šķīstošas ķimikālijas (vielas un maisījumus) (3) (6) (7) identificētu kā "nopietnus acu bojājumus izraisītājus" (ANO *GHS*/ES *CLP* 1. kategorija) vai kā "acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītājus" (ASV *EPA* I kategorija), testējamajai ķimikālijai jāinducē FL_{20} vērtība, kas ir ≤ 100 mg/ml.

Rezultātu pieņemamība

Maksimālās fluoresceīna caurplūdes vidējai vērtībai (x) jābūt lielākai par 4 000 (sk. 31. punktu), vidējai 0 % caurplūdei (y) jābūt vienādai ar vai zemākai par 300, un vidējai 100 % caurplūdei (z) jābūt no 3 700 līdz 6 000.

Testu uzskata par pieņemamu, ja pozitīvā kontrole šūnu slānim ir radījusi 20 %–40 % bojājumu (ko mēra kā fluoresceīna procentuālo caurplūdi).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Dati

Par katru testēšanas reizi tabulas veidā jāattēlo dati par atsevišķām replikātu iedobēm (piem., fluorescences intensitātes vērtības un dati par katrai testējamai ķimikālijai aprēķināto procentuālo *FL*, ieskaitot klasifikāciju). Turklāt jānorāda arī katra atsevišķā replikāta mērījumu vidējās vērtības ± SN katrā testēšanas reizē.

▼M7

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamās un kontroles ķimikālijas:

— ķīmiskais(-ie) nosaukums(-i), piem., *Chemical Abstracts Service* (*CAS*) izmantotais nosaukums un citi nosaukumi, ja tādi ir zināmi;

— ķimikālijas *CAS* numurs, ja tāds ir zināms;

— vielas vai maisījuma tīrība un sastāvs (masas procentos), ciktāl šī informācija ir pieejama;

— fizikālķīmiskās īpašības, kas attiecas uz testa norisi (piem., fizikālais stāvoklis, gaistamība, pH, stabilitāte, šķīdība ūdenī, ķīmiskā klase);

— testējamo/kontroles ķimikāliju sagatavošana pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana),

— uzglabāšanas apstākļi.

Izmantotās testēšanas metodes un protokola pamatojums

— Jāiekļauj apsvērumi par testēšanas metodes pielietojamības jomu un ierobežojumiem.

Testēšanas apstākļi:

— izmantotās šūnu sistēmas apraksts, tostarp autentiskuma sertifikāts un šūnu līnijas mikoplazmas statuss;

— sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru;

— izmantotā(-s) testējamās ķimikālijas koncentrācija(-s),

— cik ilga bijusi ekspozīcija testējamajai ķimikālijai;

— inkubācijas ar fluoresceīnu ilgums;

— testēšanas procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas;

— izmantoto izvērtēšanas kritēriju apraksts;

— atsauce uz modeļa vēsturiskajiem datiem (piem., negatīvās un pozitīvās kontroles, attiecīgā gadījumā etalonķimikālijas);

— informācija par laboratorijas pierādīto tehnisko kompetenci.

Rezultāti:

— tabulas veidā apkopoti dati par individuālām testējamām ķimikālijām un kontrolēm par katru testēšanas reizi un katru replikāta mērījumu (tostarp individuāli rezultāti, vidējās vērtības un SN);

— iegūtā(-s) klasifikācija(-s) ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju;

— jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts.

▼**M7**

Rezultātu iztirzājums

— Jāiekļauj apsvērumi par nepārliecinošu rezultātu (35. punkts: FL_{20} > 100 mg/ml) un turpmāku testēšanu.

Secinājumi

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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. Pieejams: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_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) Šā pielikuma B.5. nodaļa "*Akūts acu kairinājums/korozija*".

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Pieejams: [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.

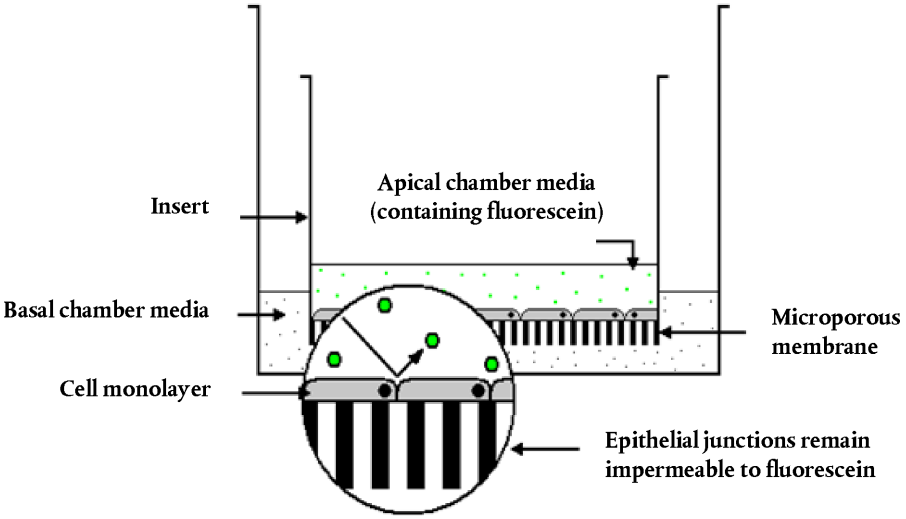
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

1. papildinājums

DIAGRAMMA: *MDCK* ŠŪNAS, KO AUDZĒ UZ INSERTA MEMBRĀNAS *FL* TESTĒŠANAS METODES VAJADZĪBĀM

MDCK šūnu konfluento slāni audzē uz inserta puscaurlaidīgās membrānas. Insertus ievieto 24 iedobju plašu iedobēs.



Attēla avots: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

2. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no tās "relevantuma" aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

***EPA* 1. kategorija**: ķimikālijas, kuras rada korozīvu ietekmi (acs audu neatgriezenisku noārdīšanos), radzenes bojājumus vai kairinājumu, kas saglabājas ilgāk par 21 dienu (2).

ES *CLP* (Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu): Eiropas Savienībā (ES) īsteno ANO *GHS* sistēmu ķimikāliju (vielu un maisījumu) klasificēšanai.

Pseidonegatīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk negatīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu rezultātu īpatsvars: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi aplami iznāk pozitīvas. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

FL_{20}: šo parametru iespējams aplēst, nosakot koncentrāciju, pie kuras testējamā ķimikālija izraisa 20 % fluoresceīna caurplūdi cauri šūnu slānim.

Fluoresceīna caurplūde: ar spektrofluorimetru izmērīts fluoresceīna daudzums, kas izplūst cauri šūnu slānim.

***GHS* (Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņotā sistēma)**: sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi.

***GHS* 1. kategorija**: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska.

Bīstamība: īpašība, kas raksturo tādu aģentu vai situāciju, kurai piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

Maisījums: ANO *GHS* kontekstā — maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām, kurā tās nereaģē.

Negatīvā kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat, kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

▼M7

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas ANO *GHS* 1., 2.A vai 2.B kategorijā, ES *CLP* 1. vai 2. kategorijā vai ASV *EPA* I, II vai III acu kairinājuma izraisītāju kategorijā.

Acu korozijas izraisītājs: a) ķimikālija, kas rada neatgriezeniskus acs audu bojājumus; b) ķimikālijas, kuras ir klasificētas kā ANO *GHS* 1. kategorijas, ES *CLP* 1. kategorijas vai ASV *EPA* I kategorijas acu korozijas izraisītājas.

Acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas pēc aplicēšanas uz acābola priekšējās virsmas acī rada atgriezeniskas pārmaiņas; b) ķimikālijas, kas ir klasificētas kā ANO *GHS* 2.A vai 2.B kategorijas, ES *CLP* 2. kategorijas vai ASV *EPA* II vai II kategorijas acu kairinājuma izraisītāji.

Nopietna acu kairinājuma izraisītājs: a) ķimikālija, kas pēc aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas izraisa acs audu bojājumus, kuri 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav atgriezeniski, vai kas izraisa nopietnu fizisku redzes pasliktināšanos; b) ķimikālijas, kuras ir klasificētas kā ANO *GHS* 1. kategorijas, ES *CLP* 1. kategorijas vai ASV *EPA* I kategorijas acu kairinājuma izraisītājas.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar ķimikāliju, par ko ir zināms, ka tā izraisa pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Standartķimikālijas: standartķimikāliju saraksta apakšgrupa, ar ko nepieredzējusi laboratorija var pierādīt savu kompetenci izmantot validēto atsauces testēšanas metodi.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (8).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē tajā pašā vai citā laboratorijā ilgākā laikā, izmantojot to pašu protokolu, var iegūt reproducējamus rezultātus. To novērtē, aprēķinot metodes reproducējamību dažādās laboratorijās un atkārtojamību tajā pašā laboratorijā.

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (8).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnīgi atgriezeniska.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, tostarp šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai

▼M7

nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu negatīvo kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā.

Viela: ANO *GHS* kontekstā tie ir dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti ķīmiskie elementi un to savienojumi, ieskaitot produkta stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Daudzpakāpju testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinājuma izraisīšanas potenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (8).

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās ķimikālijas bīstamības potenciālu.

▼M7

3. papildinājums

FL TESTĒŠANAS METODES STANDARTĶIMIKĀLIJAS

Pirms šīs testēšanas metodes regulāras izmantošanas laboratorijām vajadzētu pierādīt savu tehnisko kompetenci to izmantot, no acu korozijas viedokļa pareizi klasificējot 1. tabulā ieteiktās 8 ķimikālijas. Šīs ķimikālijas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu vietēja acu kairinājuma/korozijas atbildreakciju diapazonu, kura pamatā ir *in vivo* tests ar truša acīm (*TG* 405, TM B.5 (5)) (t. i., ANO *GHS* un ES *CLP* 1., 2.A, 2.B kategorija vai neklasificētas ķimikālijas). Tomēr, ņemot vērā *FL* testa validēto lietderīgumu (t. i., acu korozijas / nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanā), lai apliecinātu kompetenci, izmantojami tikai divi klasificēšanas nolūkiem izmantojami testa rezultāti (korozīvs/nopietns kairinājums vai korozijas / nopietna kairinājuma neesība). Citi atlases kritēriji bija ķimikāliju pieejamība tirgū, kvalitatīvu *in vivo* atsauces datu pieejamība un kvalitatīvu ar *FL* testēšanas metodi iegūtu datu pieejamība. Šā iemesla dēļ standartķimikālijas tika izraudzītas no dokumenta "Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing" (8), kas tika izmantots *FL* testēšanas metodes retrospektīvajā validācijā.

1. tabula

Ķimikālijas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot *FL* testēšanas metodi

Ķimikālija	*CAS* Nr.	Ķīmiskā klase ([1])	Agregātstāvoklis	*In vivo* klasifikācija ([2])	*In vitro* klasifikācija ([3])
Benzalkonija hlorīds (5 %)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidrs	1. kategorija	Korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājs
Prometazīna hidrohlorīds	58-33-3	Amīns/amidīns, heterociklisks savienojums, organisks sēra savienojums	Ciets	1. kategorija	Korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājs
Nātrija hidroksīds (10 %)	1310-73-2	Sārms	Šķidrs	1. kategorija	Korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājs
Nātrija laurilsulfāts (15 %)	151-21-3	Karbonskābe (sāls)	Šķidrs	1. kategorija	Korozijas / nopietna kairinājuma izraisītājs
4-karboksi-benzaldehīds	619-66-9	Karbonskābe, aldehīds	Ciets	2(A) kategorija	Nav korozīvs/nav stipri kairinošs
Amonija nitrāts	6484-52-2	Neorganisks sāls	Ciets	2(A) kategorija	Nav korozīvs/nav stipri kairinošs
Etil-2-metilaceto-acetāts	609-14-3	Ketons, esteris	Šķidrs	2(B) kategorija	Nav korozīvs/nav stipri kairinošs
Glicerīns	56-81-5	Spirts	Šķidrs	Nekategorizēta	Nav korozīvs/nav stipri kairinošs

Saīsinājumi: *CAS* Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

([1]) Ķīmiskās klases katrai testējamai ķimikālijai piešķirtas, izmantojot standarta klasifikācijas shēmu, kuras pamatā ir National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Pamatojoties uz truša acu in vivo testa rezultātiem (ESAO TG 405, TM B.5) un izmantojot ANO GHS un ES CLP sistēmu.

([3]) Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti ar FL (INVITTOX protokols Nr. 71(6)).

▼M7

B.62. **ZĪDĪTĀJU "KOMĒTAS" *IN VIVO* TESTS SĀRMAINĀ VIDĒ**

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 489 (2016). Sārmainā vidē veiktu "komētas" (atsevišķu šūnu gēla elektroforēzes) *in vivo* testu (*comet assay*) (turpmāk tekstā vienkārši "komētas tests") izmanto DNS ķēdes pārrāvumu detektēšanai šūnās vai kodolos, kas izolēti no dažādiem dzīvnieku, parasti grauzēju, audiem, kuri eksponēti potenciāli genotoksiskam(-iem) materiālam(-iem). Komētas tests ir pārskatīts, un dažādas ekspertu grupas ir publicējušas ieteikumus (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Šī testēšanas metode ir daļa no ģenētiskās toksikoloģijas testēšanas metožu klāsta. Ir izstrādāts ESAO dokuments, kas īsi informē par testēšanu ģenētiskajā toksikoloģijā un sniedz pārskatu par neseniem šīs vadlīnijas grozījumiem.

Komētas testa mērķis ir identificēt ķimikālijas, kas izraisa DNS bojājumus. Sārmainā vidē (> pH 13) ar komētas testu var detektēt vienas ķēdes vai dubultķēdes pārrāvumus, kas radušies, piem., no tiešas mijiedarbības ar DNS, sārmlabilām vietām vai sakarā ar pārejošiem DNS ķēdes pārrāvumiem, kuri rodas DNS reparācijā ar izgriešanu (ekscīziju). Šie ķēdes pārrāvumi var tikt reparēti, neradot paliekošu ietekmi, būt šūnai nāvējoši vai nostabilizēties par mutāciju, kas rada pastāvīgas dzīvotspējīgas izmaiņas. Tie var arī radīt hromosomālus bojājumus, ko arī asociē ar daudzām cilvēku slimībām, tostarp vēzi.

2006.–2012. gadā tika veikts oficiāls grauzēju *in vivo* komētas testa validācijas izmēģinājums, ko koordinēja Japānas Alternatīvo metožu validēšanas centrs (*JaCVAM*) kopā ar Eiropas Alternatīvo metožu validēšanas centru (*ECVAM*), Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteju (*ICCVAM*) un NTP Starpaģentūru alternatīvo toksikoloģisko metožu izvērtēšanas centru (*NICEATM*) (12). Šī testēšanas metode ietver komētas testa ieteicamo izmantojumu un ierobežojumus, un tās pamatā ir validācijas izmēģinājumā izmantotais galīgais protokols (12) un citi relevanti publicēti un nepublicēti (laboratoriju pašu dati — *proprietary data*) papildu dati.

Galveno terminu definīcijas sniegtas 1. papildinājumā. Jāpiebilst, ka šajā testā var izmantot daudz dažādu platformu (mikroskopu priekšmetstikliņus, gēla punktus, 96 iedobju plates u. c.). Ērtības labad turpmāk dokumentā tiek izmantots termins "priekšmetstikliņš", taču ar to apzīmē visas pārējās platformas.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

Komētas tests ir metode, ar ko eikariotiskās šūnās mēra DNS ķēdes pārrāvumus. Atsevišķas šūnas/kodolus, kas ievietoti agarozē uz priekšmetstikliņa, lizē ar detergentu un augstā sāls koncentrācijā. Šajā lizēšanas posmā tiek saēstas šūnas un kodolu membrānas, kas ļauj atbrīvoties savītām DNS cilpām, ko parasti sauc par nukleoīdiem, un DNS fragmentiem. Elektroforēzē pie augsta pH rodas komētveidīgas struktūras, ko, izmantojot piemērotas fluorescences krāsvielas, var novērot fluorescences mikroskopā; DNS fragmenti atkarībā no izmēra migrē no komētas "galvas" uz "asti", un komētas astes intensitāte attiecībā pret kopējo intensitāti (galva plus aste) atspoguļo DNS pārrāvumu daudzumu (13) (14) (15).

Komētas *in vivo* tests, ko veic sārmainā vidē, ir īpaši relevants genotoksiskās bīstamības novērtēšanā, jo šajā testā atbildreakcijas ir atkarīgas no *in vivo ADME* (absorbcija, izplatīšanās, metabolisms un izdalīšanās) un arī no DNS reparācijas procesiem. Atkarībā no šūnām, audiem un DNS bojājumu veida tie var būt atšķirīgi.

▼M7

Lai izpildītu dzīvnieku labturības prasības, jo īpaši — samazinātu izmantoto dzīvnieku skaitu (tā saucamie 3R principi — aizstāšana, samazināšana, pilnveide [*Replacement, Reduction, Refinement*]), šo testu var arī integrēt citos toksikoloģiskos pētījumos, piem., atkārtotas devas toksiskuma pētījumos (10) (16) (17), vai tā beigupunktu var apvienot ar citiem genotoksicitātes beigupunktiem, piem., no zīdītāju eritrocītu mikrokodolu *in vivo* testa (18) (19) (20). Komētas testu visbiežāk veic ar grauzējiem, kaut arī tas ir izmantots arī citām zīdītāju sugām un sugām, kas nav zīdītāji. Katrā atsevišķā gadījumā zinātniski un ētiski jāpamato tādu sugu izmantošana, kas nav grauzēji, un īpaši ieteicams komētas testu ar sugām, kas nav grauzēji, veikt vienīgi kā daļu no cita toksicitātes pētījuma, nevis kā atsevišķu testu.

Ekspozīcijas ceļš un pētāmie audi jāizvēlas, pamatojoties uz visām pieejamajām/esošajām zināšanām par testējamām ķimikālijām, piem., plānoto/paredzamo cilvēka eksponētības ceļu, metabolismu un izplatīšanos, potenciālu ietekmēt saskares vietu, strukturāliem brīdinājumiem, citiem genotoksicitātes vai toksiskuma datiem un pētījuma mērķi. Tādējādi attiecīgā gadījumā mērķaudos var analizēt testējamo ķimikāliju genotoksisko potenciālu attiecībā uz to kancerogēnu un/vai cita veida toksisku ietekmi. Uzskata, ka ar šo testu var arī sīkāk izpētīt *in vitro* sistēmā detektētu genotoksicitāti. Ir lietderīgi veikt interesējošu audu komētas *in vivo* testu, ja ir pamats gaidīt, ka interesējošie audi tiks pienācīgi eksponēti.

Šis tests starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā visplašāk ir validēts attiecībā uz žurku tēviņu somatiskajiem audiem, piem., *JaCVAM* izmēģinājumā (12) un *Rothfuss et al*., 2010 (10). *JaCVAM* starptautiskajā validācijas izmēģinājumā tika izmantotas aknas un kuņģis. Aknas tika izmantotas tāpēc, ka tas ir visaktīvākais orgāns ķimikāliju metabolisma jomā un bieži vien arī kancerogenitātes mērķorgāns. Kuņģis tika izmantots tāpēc, ka ķimikālijām tā pēc orālas ekspozīcijas parasti ir pirmā saskares vieta, kaut arī par saskares audiem jāuzskata arī citas kuņģa un zarnu trakta vietas, piem., divpadsmitpirkstu zarna un tukšā zarna, ko varētu uzskatīt par cilvēkiem relevantāku nekā grauzēju kuņģa dziedzerdaļu. Jārūpējas, lai tādi audi netiktu eksponēti pārlieku augstām testējamās ķimikālijas koncentrācijām (21). Šis paņēmiens principā ir izmantojams jebkuriem audiem, no kuriem iespējams iegūt analizējamas atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas. Vairāku laboratoriju pašu dati apliecina tā sekmīgu izmantošanu daudziem dažādiem audiem, un ir daudz publikāciju, kas apliecina šā paņēmiena pielietojamību orgāniem vai audiem, kas nav aknas un kuņģis, piem., tukšajai zarnai (22), nierēm (23) (24), ādai (25) (26) vai urīnpūslim (27) (28), plaušām un bronhoalveolārās lavāžas šūnām (kas ir relevanti pētījumiem par ieelpotām ķimikālijām) (29) (30), un ar vairākiem orgāniem ir arī veikti testi (31) (32).

Kaut arī var pastāvēt interese par genotoksisko ietekmi uz gonocītiem, jāņem vērā, ka sārmainā vidē veikts komētas standarta tests, kā aprakstīts šajā testēšanas metodē, netiek uzskatīts par piemērotu DNS ķēdes pārrāvumu mērīšanai nobriedušos gonocītos. Tā kā literatūras pārskatā par komētas testa izmantošanu attiecībā uz genotoksicitāti gonocītiem (33) tika ziņoti augsti un mainīgi fona līmeņi, tiek uzskatīts, ka jāveic protokola grozījumi un jāuzlabo standartizācijas un validācijas pētījumi, pirms testēšanas metodē var iekļaut komētas testu attiecībā uz nobriedušiem gonocītiem (piem., spermatozoīdiem). Turklāt šajā testēšanas metodē aprakstītais ieteicamais ekspozīcijas režīms nav optimāls, un, lai veiktu pilnvērtīgu analīzi par DNS ķēdes pārrāvumiem nobriedušos spermatozoīdos, būtu nepieciešami garāki ekspozīcijas vai paraugošanas laiki. Ar komētas testu izmērītā genotoksiskā ietekme sēklinieku šūnās dažādos diferenciācijas posmos ir aprakstīta literatūrā (34) (35). Tomēr jāpiebilst, ka gonādas satur gan somatiskās šūnas, gan gonocītus. Šā iemesla dēļ pozitīvi rezultāti veselā gonādā (sēkliniekos) ne vienmēr atspoguļo gonocītu bojājumus; tomēr tie norāda, ka testētā(-s) ķimikālija(-s) un/vai tās metabolīti ir gonādu sasnieguši.

▼M7

Komētas testa standarta eksperimentālajos apstākļos nav iespējams ticami detektēt šķērssaites. Noteiktos modificētos eksperimenta apstākļos iespējams detektēt DNS–DNS un DNS–proteīna šķērssaites un citas bāzu modifikācijas, piem., oksidētas bāzes (23) (36) (37) (38) (39). Taču būtu jāveic papildu darbs, lai pienācīgi raksturotu, kā jāgroza protokols. Līdz ar to šeit aprakstītā testa primārais mērķis nav šķērssaišu aģentu detekcija. Šis tests, pat ar modifikācijām, nav piemērots aneigēnu noteikšanai.

Ņemot vērā pašreizējās zināšanas, ar komētas *in vivo* testam ir vairāki papildu ierobežojumi (sk. 3. papildinājumu). Paredzams, ka šī testēšanas metode nākotnē tiks pārskatīta un nepieciešamības gadījumā pārstrādāta, ņemot vērā gūto pieredzi.

Pirms šīs testēšanas metodes izmantošanas maisījumam, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga.

METODES PRINCIPS

Dzīvniekus piemērotā ceļā eksponē testējamajai ķimikālijai. Devu došanas un paraugošanas sīks apraksts ir sniegts 36.–40. punktā. Izvēlētajā(-os) paraugošanas laikā(-os) interesējošos audus izpreparē un sagatavo atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas (ja tas šķiet lietderīgi, var veikt *in situ* perfūziju, piem., aknās), ko ievieto mīkstā agarā, lai tās imobilizētu uz priekšmetstikliņiem. Šūnas/kodolus apstrādā ar līzes buferšķīdumu, lai noņemtu šūnas un/vai kodola membrānu, un eksponē spēcīgam sārmam, piem., pH≥13, lai ļautu DNS atraisīties un atbrīvotu atvijušās DNS cilpas un fragmentus. Pēc tam agarā veic kodola DNS elektroforēzi. Normālas, nefragmentētas DNS molekulas agarā paliek savā vietā, kurā atradās kodola DNS, savukārt DNS fragmenti un atvijušās DNS cilpas migrē uz anoda pusi. Pēc elektroforēzes DNS vizualizē, izmantojot pienācīgu fluorescējošu krāsvielu. Preparātus analizē ar mikroskopu un ar pilnībā vai daļēji automātiskām attēlu analizēšanas sistēmām. DNS migrācijas apmērs un attālums elektroforēzes laikā atspoguļo DNS fragmentu daudzumu un izmēru. Komētas testam ir vairāki beigupunkti. DNS bojājumu novērtēšanā ieteikts izmantot DNS daudzumu astē (DNS procentuālo daudzumu astē vai procentuālo astes intensitāti) (12) (40) (41) (42). Pēc pietiekama kodolu skaita analīzes datus analizē ar attiecīgajām metodēm, lai izvērtētu testa rezultātus.

Jāpiebilst, ka ir konstatēts, ka dažādu šīs metodoloģijas aspektu grozīšana, tostarp paraugu sagatavošana, elektroforēzes apstākļi, vizuālās analīzes parametri (piem., krāsvielas intensitāte, mikroskopa spuldzes gaismas intensitāte un mikroskopa filtru un kameras dinamikas izmantošana) un vides apstākļi (piem., fona apgaismojums), var ietekmēt DNS migrāciju (43) (44) (45) (46).

LABORATORIJAS KVALIFIKĀCIJAS VERIFICĒŠANA

Katrai laboratorijai jāpierāda eksperimenta veikšanas kompetence attiecībā uz komētas testu, pierādot spēju iegūt pietiekami kvalitatīvas katras izmantotās sugas katra mērķaudu veida atsevišķu šūnu vai kodolu suspensijas. Preparātu kvalitāti vispirms izvērtē pēc DNS procentuālā daudzuma astē ar nesēju apstrādātu dzīvnieku šūnās, kam jābūt reproducējamā zemā diapazonā. Pašreizējie dati liecina, ka grupas vidējai procentuālajai DNS astē (pamatojoties uz mediānu vidējām vērtībām — sīkāku informāciju par šiem terminiem sk. 57. punktā) žurku aknās nebūtu vēlams pārsniegt 6 %, kas atbilstu *JaCVAM* validācijas pētījumā (12) un citos publicētajos un pašu datos reģistrētajām vērtībām. Patlaban

▼M7

nav pietiekami daudz datu, lai sniegtu ieteikumus par citu audu optimālajiem vai pieņemamajiem diapazoniem. Tas neliedz izmantot citus audus, ja tas ir pamatoti. Testēšanas pārskatā jāsniedz pienācīgs pārskats par komētas testa veiktspēju šajos audos, atsaucoties uz publicēto literatūru vai pašu datiem. Pirmkārt, kontrolēs ir vēlams panākt zemu diapazonu procentuālajai DNS daļai astē, lai nodrošinātu pietiekami dinamisku diapazonu pozitīvas ietekmes detektēšanai. Otrkārt, katrai laboratorijai ar dažādiem paņēmieniem, kas ierosināti 1. tabulā (29. punkts), jāspēj reproducēt paredzētās tiešo mutagēnu un promutagēnu atbildreakcijas.

Pozitīvās vielas var izvēlēties, piemēram, no *JaCVAM* validācijas izmēģinājuma (12) vai citiem publicētajiem datiem (sk. 9. punktu), attiecīgā gadījumā sniedzot pamatojumu, un izvēlas tādas, kuras interesējošos audos rada viennozīmīgi pozitīvu atbildreakciju. Jāparāda arī spēja detektēt zināmu mutagēnu, piem., EMS, vāju ietekmi pie zemām devām, piem., nosakot devas–atbildreakcijas sakarības ar atbilstošu devu skaitu un atstatumiem. Sākotnēji centieni jākoncentrē uz kompetences apliecināšanu darbā ar visplašāk izmantotajiem audiem, piem., žurku aknām, ja ir iespējams rezultātus salīdzināt ar esošajiem datiem un gūt paredzētos rezultātus (12). Vienlaikus var apkopot datus par citiem audiem, piem., kuņģi / divpadsmitpirkstu zarnu / tukšo zarnu, asinīm u. c. Laboratorijai jāpierāda kompetence darbā ar katriem katras sugas audiem, ko tā plāno pētīt, un jāpierāda, ka tā ar zināmu mutagēnu (piemēram, EMS) minētajos audus var izsaukt pieņemamu pozitīvu atbildreakciju.

Nesēja/negatīvās kontroles dati jāapkopo, lai pierādītu negatīvo datu atbildreakciju reproducējamību un nodrošinātu, ka šī testa tehniskie aspekti tikuši pienācīgi kontrolēti, vai konstatētu, ka nepieciešams atkārtoti noteikt vēsturisko kontroļu diapazonus (sk. 22. punktu).

Jāpiebilst, ka, kaut arī dažādus audus iespējams iegūt autopsijā un apstrādāt komētas testa vajadzībām, laboratorijai jābūt kvalificētai dažādu audu ieguvē no viena dzīvnieka, tādējādi nodrošinot, ka netiek zaudēts neviens iespējamais DNS bojājums un komētas tests netiek ietekmēts negatīvi. Izšķirošs var būt laiks no eitanāzijas līdz apstrādei paredzēto audu noņemšanai (sk. 44. punktu).

Attīstot šā testa veikšanai nepieciešamo kompetenci, jāņem vērā dzīvnieku labturība, tādēļ attīstot kompetenci dažādajos šā testa aspektos, var izmantot citos testos izmantoto dzīvnieku audus. Turklāt jaunas testēšanas metodes ieviešanas laikā laboratorijā nav obligāti jāveic pilns pētījums un vajadzīgo prasmju uzlabošanai var izmantot mazāk dzīvnieku vai testa koncentrāciju.

Dati par vēsturiskajām kontrolēm

Kompetences noskaidrošanas gaitā laboratorijai jāizveido vēsturisko datu bāze, lai noteiktu attiecīgo audu un sugu pozitīvo un negatīvo kontroļu diapazonus un sadalījumus. Ieteikumi par vēsturisko datu apkopošanu un izmantošanu (t. i., kritēriji datu iekļaušanai vēsturiskajos datos un izslēgšanai no tiem un konkrēta eksperimenta pieņemamības kritēriji) atrodami literatūrā (47). Dažādi audi un dažādas sugas, kā arī dažādi nesēji un ievadīšanas ceļi var dot dažādas negatīvo kontroļu vērtības procentuālajai DNS daļai astē. Tāpēc ir svarīgi katriem audiem

▼M7

un katrai sugai noteikt negatīvo kontroļu diapazonus. Lai noteiktu laboratorijas datu variabilitāti un parādītu, ka laboratorijā šī metodoloģija "tiek kontrolēta", laboratorijām jāizmanto kvalitātes kontroles metodes, piem., kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (48)). Var būt nepieciešams arī piemērotu pozitīvās kontroles vielu, devu diapazonu un eksperimentālo apstākļu (piem., elektroforēzes apstākļu) izvēli optimizēt tā, lai detektētu vāju ietekmi (sk. 17. punktu).

Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā to atbilstību laboratorijas esošajām vēsturisko kontroļu datubāzēm. Jebkādu būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

METODES APRAKSTS

Sagatavošanās

Dzīvnieku sugas izvēle

Jāizmanto veseli, jauni pieauguši tipisku laboratorijas celmu grauzēji (apstrādes sākumā 6–10 nedēļas veci, bet ir pieņemami arī mazliet vecāki dzīvnieki). Grauzēju sugas izvēles pamatā jābūt tam, i) kādas sugas izmantotas citos toksiskuma pētījumos (lai būtu iespējams korelēt datus un varētu pētījumus integrēt), ii) kādām sugām kancerogenitātes pētījumā radušies audzēji (kancerogēniskā mehānisma pētīšanā) vai iii) kuras sugas metabolisms ir visrelevantākais cilvēka metabolismam, ja tas ir zināms. Šim testam parasti izmanto žurkas. Tomēr var izmantot citas sugas, ja tas ir ētiski un zinātniski pamatoti.

Dzīvnieku turēšanas un barošanas apstākļi

Telpā, kurā tur eksperimenta dzīvniekus, ideālā gadījumā jābūt 22°C (± 3°C) temperatūrai. Ideālā gadījumā relatīvajam mitrumam jābūt 50–60 % robežās, bet katrā ziņā vismaz 30 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas — tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Barības izvēli var ietekmēt vajadzība tai piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā. Ja nav gaidāma agresīva uzvedība, grauzēji jātur nelielās (parasti ne vairāk par pieciem vienkopus) viena dzimuma dzīvnieku grupās. Vienīgi tad, ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Pēc iespējas jāizmanto cietas grīdas, jo režģa grīdas var radīt nopietnus ievainojumus (49). Jānodrošina pienācīgs vides bagātinājums.

Dzīvnieku sagatavošana

Dzīvniekus kontroles un apstrādes grupās iedala nejauši. Dzīvniekus unikālā veidā identificē un vismaz piecas dienas pirms apstrādes sākšanas aklimatizē laboratorijas apstākļiem. Jāizmanto vismazāk invazīvā dzīvnieku unikālās identificēšanas metode. Piemērotas metodes ir, piem., apgredzenošana, krotālijas, mikroshēmas ievietošana un biometriskā identificēšana. Ausu vai pirkstu apgriešana šajos testos nav zinātniski pamatota. Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 %.

Devu sagatavošana

Pirms dzīvniekiem dot devas, cietas testējamās ķimikālijas jāizšķīdina vai jāsuspendē piemērotos nesējos vai jāpiejauc barībai vai dzeramajam ūdenim. Šķidras testējamās ķimikālijas var dot tādas pašas vai pirms došanas atšķaidīt. Atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām inhalatīvā ekspozīcija var notikt ar gāzi, tvaiku vai cietu/šķidru daļiņu aerosolu (50) (51).

Ja vien dati par testējamās ķimikālijas preparātu stabilitāti neliecina, ka tos var uzglabāt, un neparedz pienācīgus uzglabāšanas apstākļus, jāizmanto svaigi pagatavoti preparāti.

▼M7

Testēšanas apstākļi

Nesējs

Lietotajās devās nesējam nedrīkst būt toksiskas ietekmes un tas nedrīkst būt spējīgs reaģēt ar testējamo ķimikāliju. Ja tiek izmantoti citi, mazāk izpētīti nesēji, to ietveršana jāpamato ar atsauces datiem par to saderību ar testa dzīvnieku, ievadīšanas ceļu un beigupunktu. Kad vien iespējams, vispirms jāapsver, vai neizmantot šķīdinātāju vai nesēju uz ūdens bāzes. Jāņem vērā, ka daži nesēji (jo īpaši viskozi nesēji) saskares vietā var izraisīt iekaisumu un palielināt DNS ķēdes pārrāvumu fona līmeņus, jo īpaši, ja ievadīšanu veic vairākkārt.

Kontroles

Pozitīvās kontroles

Šobrīd katrā testā parasti jāizmanto grupa ar vismaz 3 analizējamiem viena dzimuma dzīvniekiem vai, ja izmanto abus dzimumus, abu dzimumu dzīvniekiem (sk. 32. punktu), ko apstrādā ar pozitīvās kontroles vielu. Nākotnē varbūt būs iespējams pierādīt pienācīgu kompetenci un vajadzību pēc pozitīvām kontrolēm tā samazināt. Ja tiek izmantoti vairāki paraugošanas laiki (piem., ar vienas ievadīšanas protokolu), pozitīvās kontroles jāiekļauj tikai vienā paraugošanas laikā, bet jānodrošina līdzsvarots plāns (sk. 48. punktu). Paralēlās pozitīvās kontroles vielas nav jāievada tādā pašā ceļā kā testējamā ķimikālija, taču ir svarīgi to pašu ceļu izmantot, mērot ietekmi saskares vietā. Jābūt pierādītam, ka pozitīvās kontroles vielas visos attiecībā uz testējamo ķimikāliju interesējošajos audos inducē DNS ķēdes pārrāvumus, un ļoti iespējams, ka par pozitīvo kontroli tiks izraudzīta EMS, jo tā ir izraisījusi DNS ķēdes pārrāvumus visos pētītajos audos. Pozitīvās kontroles vielu devas jāizvēlas tā, lai radītu vidēju ietekmi, kas dotu iespēju kritiski novērtēt testa veiktspēju un jutību, un to izvēlē var balstīties uz laboratorijas kompetences apliecināšanas laikā izstrādātajām devas–atbildreakcijas līknēm. Procentuālajai DNS daļai astē paralēlās pozitīvās kontroles dzīvniekos jāsakrīt ar diapazonu, kas laboratorijā iepriekšnoteikts attiecīgajiem audiem un attiecīgās sugas paraugošanas laikam (sk. 16. punktu). Pozitīvās kontroles vielu un dažu to mērķaudu (grauzējiem) piemēri sniegti 1. tabulā. Vielas, kuras nav norādītas 1. tabulā, var izvēlēties, ja tas ir zinātniski pamatoti.

1. tabula

Pozitīvās kontroles vielu un dažu to mērķaudu piemēri

Vielas un *CAS* Nr.
Etilmetānsulfonāts (*CAS* Nr. 62-50-0) jebkuriem audiem
Etilnitrozourīnviela (*CAS* Nr. 759-73-9) aknām un kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai
Metilmetānsulfonāts (*CAS* Nr. 66-27-3) aknām, kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai, plaušu un bronhoalveolārās lavāžas (BAL) šūnām, nierēm, urīnpūslim, plaušām, sēkliniekiem un kaulu smadzenēm/asinīm
N-metil-*N*′-nitro-*N*-nitrozoguanidīns (*CAS* Nr. 70-25-7) kuņģim, divpadsmitpirkstu zarnai vai tukšajai zarnai
1,2-dimetilhidrazīns 2HCl (*CAS* Nr. 306-37-6) aknām un zarnām
N-metil-*N*-nitrozourīnviela (*CAS* Nr. 684-93-5) aknām, kaulu smadzenēm, asinīm, nierēm, kuņģim, tukšajai zarnai un smadzenēm.

▼M7

Negatīvās kontroles

Negatīvās kontroles dzīvnieku grupa, kas apstrādāta tikai ar nesēju, bet citādi apstrādāta tāpat kā apstrādes grupas, katrā testā jāiekļauj par katru paraugošanas reizi un audiem. DNS procentuālajai daļai astē negatīvās kontroles dzīvniekos jāietilpst fona diapazonā, kas laboratorijā iepriekšnoteikts katriem audiem un attiecīgās sugas paraugošanas laikam (sk. 16. punktu). Ja nav vēsturisku vai publicētu kontroles datu, kas parāda, ka izvēlētais nesējs, ievadīšanas reižu skaits vai ievadīšanas ceļš neinducē kaitīgu vai genotoksisku ietekmi, pirms pilna pētījuma veikšanas jāveic sākotnēji pētījumi, lai noteiktu nesēja kontroles pieņemamību.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

Kaut arī par mātītēm ir pārāk maz datu, lai varētu abus dzimumus salīdzināt komētas testa izpildes kontekstā, citas *in vivo* genotoksicitātes atbildreakcijas kopumā tēviņos un mātītēs ir līdzīgas, tāpēc lielāko daļu pētījumu var veikt ar jebkura dzimuma dzīvniekiem. Dati, kas liecinātu par relevantām atšķirībām starp tēviņiem un mātītēm (piem., atšķirībām, kas saistītas ar sistēmisko toksicitāti, metabolismu, biopieejamību u. c., piem., diapazona noteikšanas pētījumā), mudinātu izmantot abus dzimumus. Tādā gadījumā var būt lietderīgi veikt pētījumu ar abu dzimumu dzīvniekiem, piem., atkārtotas devas toksicitātes pētījuma ietvaros. Izmantojot abu dzimumu dzīvniekus, var būt lietderīgi izmantot faktoriālo plānu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt datus, izmantojot šo plānu, ir sniegta 2. papildinājumā.

Sākot pētījumu (un kompetences pierādīšanas laikā), jāizveido tādas grupas, lai katrā grupā būtu vismaz 5 analizējami viena dzimuma dzīvnieki vai, ja tiek izmantoti abi dzimumi, katra dzimuma dzīvnieki (paralēlajā pozitīvajā kontrolgrupā mazāk — sk. 29. punktu). Gadījumos, kad cilvēka organisma eksponētība ķimikālijām var būt atšķirīga atkarībā no dzimuma, kā ir, piemēram, ar dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem. Ar piemēru ilustrējot maksimālā tipiskā dzīvnieku skaita prasības — atbilstīgi 33. punktā paredzētajiem parametriem pētījumā ar trim devu grupām un paralēlām negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm (pieci viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā) būtu nepieciešami 25–35 dzīvnieki.

APSTRĀDES KĀRTĪBA

Dzīvnieki 2 vai vairāk dienas ik dienas jāapstrādā (t. i., divas vai vairāk apstrādes ar apmēram 24 stundu intervālu), un paraugošana jāveic vienu reizi 2–6 stundas (vai T_{max}) pēc pēdējās apstrādes (12). Ir pieņemami paraugi no garākiem devu došanas režīmiem (piem., devu došana katru dienu 28 dienas pēc kārtas). Ir pierādīts, ka komētas tests un eritrocītu mikrokodolu testi ir veiksmīgi apvienojami (10) (19). Tomēr rūpīgi jāņem vērā loģistika, kas saistīta ar audu paraugošanu komētas testa vajadzībām, līdzās audu paraugošanas prasībām citu veidu toksikoloģiskajiem novērtējumiem. Vairumā gadījumu nav pieņemami veikt

▼M7

ievākšanu 24 stundas pēc pēdējās devas došanas, kas ir raksturīgi vispārējiem toksiskuma pētījumiem (sk. 40. punktu par paraugošanas laiku). Citu apstrādes un paraugošanas grafiku izmantošana jāpamato (sk. 3. papildinājumu). Piemēram, var izmantot vienu apstrādi ar vairākkārtēju paraugošanu, taču jāņem vērā, ka pētījumā, kurā paredzēta viena ievadīšana, būs nepieciešams vairāk dzīvnieku, jo būs jāveic vairākas paraugošanas, bet atsevišķos gadījumos tas var būt vēlami, piemēram, kad testējamā ķimikālija pēc atkārtotas ievadīšanas inducē pārmērīgu toksiskumu.

Neatkarīgi no tā, kā tests tiek veikts, tas ir pieņemami, ja vien testējamā ķimikālija rada pozitīvu atbildreakciju vai — negatīva pētījuma gadījumā — ir iegūti tieši vai netieši pierādījumi, ka mērķaudi ir eksponēti vai uz tiem atstāta toksiska ietekme, vai sasniegta robeždeva (sk. 36. punktu).

Testējamās ķimikālijas devu var dot arī dalīti, t. i., divreiz vienā un tajā pašā dienā ar ne vairāk kā 2–3 stundu starpību, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jāievada liels tilpums. Šādos apstākļos paraugošanas laiks jāplāno, pamatojoties uz pēdējās devas ievadīšanas laiku (skatīt 40. punktu).

Devu līmeņi

Ja tiek veikts iepriekšējs diapazona noteikšanas pētījums, jo no citiem relevantiem pētījumiem nav pieejami piemēroti dati, kas palīdzētu izvēlēties devu, tas jāveic tajā pašā laboratorijā, izmantojot to pašu sugu, celmu, dzimumu un apstrādes režīmu, kas tiks izmantots galvenajā pētījumā, saskaņā ar pašreizējām pieejām devu diapazona noteikšanas pētījumu veikšanā. Pētījums jāveic ar mērķi identificēt maksimālo panesamo devu (*MTD*), kas ir deva, kura pētījuma ilgumam atbilstošā laikā izraisa nelielu toksisku ietekmi (piem., tādas skaidras klīniskās pazīmes kā anormāla uzvedība vai reakcijas, neliela ķermeņa svara samazināšanās vai citotoksicitāte mērķaudos), bet neizraisa nāvi vai tādas sāpju, ciešanu vai diskomforta pazīmes, kā dēļ būtu jāveic eitanāzija. Attiecībā uz testējamo ķimikāliju, kas nav toksiska un kuras ievadīšanas periods ir 14 vai vairāk dienas, maksimālā (robež)deva ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Attiecībā uz 14 dienu vai īsāku ievadīšanas periodu maksimālā (robež)deva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara dienā. Atsevišķiem testējamo ķimikāliju veidiem (piem., cilvēku zālēm), uz kuriem attiecas konkrētas prasības, šīs robežas var atšķirties.

Ķimikālijas, pie kurām novērojams toksikokinētisko procesu piesātinājums vai kuras inducē detoksifikācijas procesus, kas pēc ilgtermiņa ievadīšanas var radīt eksponētības samazinājumu, var būt devu noteikšanas kritēriju izņēmumi, un katrs gadījums jāizvērtē atsevišķi.

Attiecībā uz akūtām un subakūtām komētas testa versijām, lai parādītu ar devu saistītas atbildreakcijas, papildus maksimālajai devai (*MTD*, maksimālajai praktiskajai devai, maksimālajai eksponētībai vai robeždevai) katram paraugošanas laikam jāizvēlas lejupēja sekvence ar vismaz diviem papildu devu līmeņiem pienācīgā atstatumā (vēlams, lai atstatums nepārsniegtu 10). Tomēr izmantotajiem devu līmeņiem būtu arī jāaptver diapazons, kas aptver gan maksimālo devu, gan devu, kas ir maztoksiska vai netoksiska. Ja pie visiem testētajiem devu līmeņiem tiek novērota toksiska ietekme uz mērķaudiem, ieteicams veikt vēl vienu pētījumu ar netoksiskām devām (sk. 54.–55. punktu). Pētījumos, kuros plānots pilnīgāk izmeklēt devas–atbildreakcijas līknes formu, var būt nepieciešams izmantot papildu devu grupu(-as).

Devu ievadīšana

Testa plānošanā jāņem vērā, kāds varētu būt cilvēka ekspozīcijas ceļš. Ja vien tas ir pamatoti, var izvēlēties dažādus ekspozīcijas ceļus, piem., uzņemšanu ar barību, dzeramo ūdeni, ievadīšanu zemādas audos, intravenozu ievadīšanu, uzņemšanu orālā ceļā (ar gavāžu), inhalāciju, uzņemšanu intratraheāli vai implantācijas ceļā. Jebkurā gadījumā ceļš jāizvēlas tā, lai nodrošinātu mērķaudu pienācīgu ekspozīciju. Parasti nav ieteicama intraperitoneāla injekcija, jo cilvēkam šāds ekspozīcijas ceļš nav raksturīgs, un tā jāizmanto tikai ar konkrētu zinātnisko pamatojumu (piem., dažām pozitīvās kontroles vielām, pētnieciskiem nolūkiem

▼M7

vai dažiem medikamentiem, kurus ievada intraperitoneāli). Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt ar gavāžu vai injekciju, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml/100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķīdumu gadījumu, kad var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Lielāka tilpuma izmantošana (ja to atļauj dzīvnieku labturības tiesību akti) jāpamato. Kad vien iespējams, dažādi devu līmeņi jāiegūst, koriģējot devas preparāta koncentrāciju, lai visos devu līmeņos tilpuma attiecība pret ķermeņa svaru saglabātos vienāda.

Paraugošanas laiks

Paraugošanas laiks ir izšķirīgi svarīgs parametrs, jo tas ir atkarīgs no perioda, kāds nepieciešams, lai testējamās ķimikālijas mērķaudos sasniegtu maksimālo koncentrāciju un tiktu inducēti DNS ķēdes pārrāvumi, bet nenotiktu šo pārrāvumu izzušana, reparācija vai neiestātos šūnas nāve. Daži bojājumi, kas izraisa DNS ķēdes pārrāvumus, kurus detektē ar komētas testu, vismaz dažām *in vitro* testētām ķimikālijām var būt ļoti īslaicīgi (52) (53). Attiecīgi, ja ir aizdomas par tādiem pārejošiem DNS bojājumiem, jāveic pasākumi to zuduma mazināšanai, nodrošinot, ka audi tiek paraugoti pietiekami agri, iespējams, pat ātrāk nekā tālāk norādītajos noklusējuma laikos. Optimālais(-ie) paraugošanas laiks(-i) var būt specifisks(-i) ķimikālijai vai ievadīšanas ceļam, kas nozīmē, piemēram, audu strauju ekspozīciju intravenozas ievadīšanas vai inhalatīvās ekspozīcijas gadījumā. Attiecīgi, ja tas ir iespējams, paraugošanas laiki jānosaka, ņemot vērā kinētiskos datus (piem., laiku (T_{max}), kurā tiek panākta maksimālā koncentrācija plazmā vai audos (C_{max}), vai, ja tiek veiktas vairākas ievadīšanas, stabilo stāvokli). Ja kinētiskie dati nav pieejami, piemērots genotoksicitātes mērīšanas kompromiss ir paraugošana 2–6 stundas pēc pēdējās apstrādes, ja veic divas vai vairāk apstrādes, vai gan 2–6, gan 16–26 stundas pēc vienas ievadīšanas, kaut arī jārūpējas, lai visu dzīvnieku autopsija tiktu veikta vienā laikā pēc pēdējās (vai vienīgās) devas ievadīšanas. Lai izvēlētos pienācīgus paraugošanas laikus, drīkst izmantot arī informāciju par toksiskās ietekmes izpausmēm mērķorgānos (ja tāda ir pieejama).

Novērojumi

Vispārēji testa dzīvnieku veselības klīniskie novērojumi jāveic un jāreģistrē vismaz reizi dienā, vēlams, katru dienu vienā(-os) laikā(-os), ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumlaiku pēc devas ievadīšanas (54). Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību. Ilgākos pētījumos dzīvnieki vismaz reizi nedēļā un testa perioda beigās jānosver. Pārtikas patēriņš jāmēra katru reizi, kad pārtika tiek mainīta, un vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzeramo ūdeni, ūdens patēriņš jāmēra katru reizi, kad ūdens tiek mainīts, un vismaz reizi nedēļā. Dzīvniekus, kam novērojamas pārliekas toksicitātes neletālas pazīmes, pirms testa perioda beigām eitanazē un komētas testa analīzē parasti neizmanto.

Audu ievākšana

Tā kā pētīt DNS ķēdes pārrāvumu ("komētu") inducēšanos var ar praktiski jebkuriem audiem, skaidri jāpamato ņemamo audu izvēle, un tās pamatā jābūt pētījuma veikšanas iemeslam kopā ar esošajiem *ADME*, genotoksicitātes, kancerogenitātes datiem vai citiem datiem par izmeklēto testējamo ķimikāliju toksiskumu, ja tādi ir. Jāapsver arī tādi svarīgi faktori kā ievadīšanas ceļš (pamatojoties uz domājamo(-ajiem) cilvēka eksponētības ceļu(-iem)), prognozētā izplatīšanās audos un absorbcija, metabolisma loma un iespējamais testējamo ķimikāliju

▼M7

iedarbības mehānisms. Visbiežāk pētītie audi, par kuriem ir visvairāk datu, ir aknas. Tāpēc, ja nav pieejama nekāda fona informācija un netiek identificēti nekādi konkrēti interesējošie audi, būtu pamatoti paraugot aknas, jo tā ir ksenobiotiskā metabolisma galvenā vieta un bieži vien ir būtiski eksponēta gan sākotnējai(-ām) vielai(-ām), gan metabolītam(-iem). Dažos gadījumos vispiemērotāk ir analizēt tiešās saskares vietu (piem., orāli ievadītām ķimikālijām tā ir kuņģa dziedzerdaļa vai divpadsmitpirkstu zarna / tukšā zarna, savukārt ieelpotām ķimikālijām — plaušas). Papildu vai alternatīvus audus izvēlas, pamatojoties uz konkrētajiem testa veikšanas iemesliem, bet var būt lietderīgi analizēt vairākus viena dzīvnieka audus, ja vien laboratorija ir apliecinājusi savu kompetenci darbā ar šiem audiem un kompetenci vairāku audu vienlaicīgā apstrādāšanā.

Paraugu sagatavošana

Attiecībā uz turpmākajos punktos (44.–49.) aprakstītajiem procesiem ir svarīgi visus šķīdumus vai stabilās suspensijas izlietot pirms to derīguma termiņa beigām vai, ja nepieciešams, tos sagatavot no jauna. Vēl turpmākajos punktos par izšķirīgi svarīgiem mainīgajiem (sk. definīcijas 1. papildinājumā) tiek uzskatīts laiks, kas nepieciešams, lai i) pēc autopsijas noņemtu audus, ii) audus iestrādātu šūnu/-kodolu suspensijās un iii) suspensiju apstrādātu un sagatavotu priekšmetstikliņus; tam, cik ilgs var būt katrs posms, jau jābūt noteiktam šīs metodes ieviešanas un kompetences pierādīšanas laikā.

Dzīvniekus eitanazē atbilstīgi spēkā esošajiem dzīvnieku labturības tiesību aktiem un 3R principiem un pienācīgā(-os) laikposmā(-os) pēc pēdējās apstrādes ar testējamo ķimikāliju. Izraudzītos audus izņem, izpreparē un daļu savāc komētas testa mērķim, bet vienlaicīgi daļa no tiem pašiem audiem jānogriež un jāievieto formaldehīda šķīdumā vai pienācīgā fiksējošajā šķīdumā iespējamai patoloģiskās histoloģijas analīzei (sk. 55. punktu) saskaņā ar standarta metodēm (12). Komētas testam paredzētos audus ievieto smalcināšanas buferšķīdumā, noskalo ar pietiekamu daudzumu auksta smalcināšanas buferšķīduma, lai novāktu asins paliekas, un līdz pārstrādei uzglabā ledusaukstā smalcināšanas buferšķīdumā. Var veikt arī *in situ* perfūziju, piem., aknām, nierēm.

Attiecībā uz šūnu/kodolu izolēšanu ir daudz publicētu metožu. Tās ietver tādu audu kā aknu un nieru smalcināšanu, gļotādas virsmu nokasīšanu kuņģa–zarnu trakta gadījumā, homogenizāciju un fermentatīvo noārdīšanu. *JaCVAM* validācijas izmēģinājumā tika pētītas vienīgi izolētas šūnas, tādēļ attiecībā uz metodes ieviešanu un iespēju kompetences apliecināšanai izmantot *JaCVAM* izmēģinājuma datus vēlams izmantot izolētas šūnas. Tomēr ir pierādīts, ka nav būtiskas atšķirības starp to testu rezultātiem, kuros tika izmantotas izolētas šūnas, un to testu rezultātiem, kuros tika izmantoti izolēti kodoli (8). Salīdzināmus rezultātus sniedza arī dažādas šūnu/kodolu izolēšanas metodes (piem., homogenizācija, smalcināšana, fermentatīvā noārdīšanā un filtrēšana caur sietu) (55). Līdz ar to iespējams izmantot izolētas šūnas vai izolētus kodolus. Laboratorijā rūpīgi jāizvērtē un jāvalidē audiem specifiskas atsevišķu šūnu/kodolu izolēšanas metodes. Kā iztirzāts 40. punktā, dažu tādu bojājumu noturība, kuri rada komētas testā detektējamus DNS ķēdes pārrāvumus, var būt ļoti īslaicīga (52) (53). Tāpēc neatkarīgi no atsevišķu šūnu/kodolu suspensiju sagatavošanā izmantotās metodes ir svarīgi audus apstrādāt iespējami drīz pēc dzīvnieku eitanāzijas un turēt tādos apstākļos, kas samazina bojājumu izzušanu (piem., turot audus zemā temperatūrā). Šūnu suspensijas līdz to izmantošanai jāuzglabā ledusaukstas, lai būtu iespējams uzrādīt minimālu variāciju starp paraugiem un pienācīgas pozitīvās un negatīvās kontroles atbildreakcijas.

▼M7

PRIEKŠMETSTIKLIŅU SAGATAVOŠANA

Priekšmetstikliņi jāsagatavo iespējami drīz (ideālā gadījumā — vienas stundas laikā) pēc atsevišķu šūnu/kodolu sagatavošanas, bet laboratorijas apstākļos stingri jākontrolē un jāvalidē temperatūra un laiks no dzīvnieka nāves līdz priekšmetstikliņu sagatavošanai. Priekšmetstikliņu sagatavošanai izmantotais šūnu suspensijas tilpums, kas pievienots zema kušanas punkta agarozei (parasti 0,5–1,0 %), nedrīkst samazināt zema kušanas punkta agarozes procentuālo daudzumu līdz tādam, kas ir mazāks par 0,45 %. Optimālo šūnu blīvumu nosaka ar attēlu analīzes sistēmu, ko izmanto "komētu" novērtēšanā.

Lizēšana

Arī lizēšanas apstākļi ir izšķirīgi svarīgs mainīgais un var ietekmēt ķēdes pārrāvumus, ko izraisa konkrētu veidu DNS modifikācijas (noteiktas DNS alkilācijas un bāzu adukti). Tādēļ eksperimenta laikā lizēšanas apstākļus visiem priekšmetstikliņiem ieteicams saglabāt iespējami nemainīgus. Līdzko priekšmetstikliņi ir sagatavoti, tie vismaz uz stundu (vai uz nakti) jāiegremdē atdzesētā lizēšanas šķīdumā apmēram 2–8 °C temperatūrā pie vāja apgaismojuma, piem., dzeltenas gaismas (vai bezgaismas vidē), lai novērstu eksponētību baltajai gaismai, kas var saturēt UV komponentus. Pēc šā inkubācijas perioda priekšmetstikliņi jānoskalo, lai pirms sārmatraisīšanas posma noņemtu detergenta atliekas un sāļus. Tam var izmantot attīrītu ūdeni, neitralizēšanas buferšķīdumu vai fosfāta buferšķīdumu. Var izmantot arī elektroforēzes buferšķīdumu. Tādējādi elektroforēzes kamerā tiktu saglabāta sārmaina vide.

Atraisīšanās un elektroforēze

Priekšmetstikliņus nejaušināti novieto uz zemūdenei līdzīgas elektroforēzes ierīces platformas, kas satur pietiekami daudz elektroforēzes šķīduma, tā, lai priekšmetstikliņu virsmas ar to būtu pilnīgi pārklātas (arī pārklājuma dziļumam katrā testēšanas reizē jābūt nemainīgam). Citās komētas testa elektroforēzes ierīcēs ar aktīvu dzesēšanu, cirkulāciju un lielu elektroapgādes jaudu, lielāks šķīduma pārklājums radīs lielāku elektrisko strāvu, spriegumam saglabājoties nemainīgam. Lai elektroforēzes tvertnē ievietotu priekšmetstikliņus, jāizmanto līdzsvarota pieeja, kas tvertnē mazinātu jebkādas tendences vai malas efektu un līdz minimumam samazinātu mainību starp partijām, t. i., katrā elektroforēzes reizē jābūt vienādam priekšmetstikliņu skaitam no katra pētījumā izmantotā dzīvnieka un jāiekļauj paraugi no dažādajām devu grupām, negatīvajām un pozitīvajām kontrolēm. Lai DNS varētu atraisīties, priekšmetstikliņi jāatstāj uz vismaz 20 minūtēm un pēc tam kontrolētos apstākļos tiem jāveic elektroforēze, kas līdz maksimumam palielina testa jutības un dinamikas diapazonu (t. i., negatīvām un pozitīvām kontrolēm rada pieņemamus procentuālos DNS līmeņus astē, kas palielina jutību). DNS migrācijas līmenis ir lineāri saistīts ar elektroforēzes ilgumu un

▼M7

arī ar potenciālu (V/cm). Balstoties uz *JaCVAM* pētījumu, tas varētu būt 0,7 V/cm uz vismaz 20 minūtēm. Elektroforēzes ilgums tiek uzskatīts par izšķirīgi svarīgu mainīgo, un elektroforēzes laiks jānosaka tā, lai optimizētu dinamisko diapazonu. Garāki elektroforēzes laiki (piem., 30 vai 40 minūtes, lai līdz maksimumam palielinātu jutību) parasti rada spēcīgākas pozitīvās atbildreakcijas uz zināmiem mutagēniem. Tomēr garāki elektroforēzes laiki var arī radīt pārmērīgu migrāciju kontrolparaugos. Katrā eksperimentā spriegums jāsaglabā nemainīgs un citu parametru mainībai jāietilpst šaurā un konkrētā diapazonā, piem., *JaCVAM* izmēģinājumā pie 0,7 V/cm sākotnējā strāva bija 300 mA. Buferšķīduma dziļums jāpielāgo tā, lai panāktu nepieciešamos apstākļus, un tas jāsaglabā visu eksperimenta laiku. Elektroforēzes sākumā un beigās jāreģistrē strāva. Tāpēc optimālie apstākļi katriem pētītajiem audiem jānosaka sākotnējā attiecīgās laboratorijas kompetences pierādīšanā. Elektroforēzes šķīduma temperatūra atraisīšanās un elektroforēzes laikā jāsaglabā zemā līmenī, parasti 2–10 °C (10). Elektroforēzes šķīduma temperatūra jāreģistrē atraisīšanās sākumā, elektroforēzes sākumā un elektroforēzes beigās.

Pēc elektroforēzes pabeigšanas priekšmetstikliņi uz vismaz 5 minūtēm jāiegremdē/jānoskalo neitralizācijas buferšķīdumā. Gēlus var iekrāsot un novērtēt "svaigus" (piem., 1–2 dienu laikā) vai dehidrēt vēlākai novērtēšanai (piem., 1–2 nedēļu laikā pēc iekrāsošanas) (56). Tomēr šie apstākļi jāvalidē kompetences pierādīšanas laikā, un par katru no šiem apstākļiem atsevišķi jāiegūst un jāsaglabā vēsturiskie dati. Pēdējā gadījumā priekšmetstikliņi jādehidrē, tos uz vismaz 5 minūtēm iegremdējot absolūtā etanolā, tiem jāļauj nožūt un tie līdz novērtēšanai jāglabā istabas temperatūrā vai traukā ledusskapī.

Mērīšanas metodes

Komētas jāuzskaita kvantitatīvi, izmantojot automātisku vai daļēji automātisku attēlu analīzes sistēmu. Priekšmetstikliņus iekrāso ar pienācīgu fluorescējošu krāsvielu, piem., *SYBR Gold*, *Green I*, propīdija jodīdu vai etīdija bromīdu, un mēra, izmantojot ar epifluorescenci un pienācīgiem detektoriem vai digitālu (piem., *CCD*) kameru aprīkotu mikroskopu, atbilstošā palielinājumā (piem., 200x).

Šūnas var klasificēt trīs kategorijās, kas aprakstītas komētu attēlu atlantā (57), proti, novērtējamas, nenovērtējamas un *Hedgehog* šūnas (sīkāku izklāstu sk. 56. punktā). Lai izvairītos no artefaktiem, attiecībā uz procentuālo DNS daļu astē jāvērtē tikai novērtējamas šūnas (skaidri saredzama galva un aste bez apkārtējo šūnu radītiem traucējumiem). Nav nepieciešams ziņot par nenovērtējamo šūnu biežumu. *Hedgehog* šūnu biežums jānosaka, pamatojoties uz vizuālo novērtēšanu (tā kā tām nav skaidri saredzama galva, tās nav viegli detektēt attēlu analīzē) ar vismaz 150 šūnām uz vienu paraugu (sīkāku izklāstu sk. 56. punktā), un atsevišķi jādokumentē.

Visi analizējamie priekšmetstikliņi, tostarp no pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm, neatkarīgi jākodē un jāvērtē aklināti, lai vērtētājam nebūtu zināms, vai un kā tie apstrādāti. No katra parauga (katra dzīvnieka katra veida audiem) jāanalizē vismaz 150 šūnas (izņemot *Hedgehog* šūnas — sk. 56. punktu). Ja vismaz 5 dzīvniekos uz vienu devu katrā dzīvniekā tiek novērtētas 150 šūnas (paralēlajā pozitīvajā kontrolē mazāk — sk. 29. punktu), saskaņā ar *Smith et al.* 2008. gada analīzi tiek panākta pietiekama statistiskā jauda (5). Ja izmanto priekšmetstikliņus, to var panākt, uzskaitot 2 vai 3 katra parauga priekšmetstikliņus, ja katrā grupā tiek izmantoti pieci dzīvnieki. Jāaplūko vairākas priekšmetstikliņa vietas, kur blīvums ir tāds, ka noteikti nenotiek astu pārklāšanās. Jāvairās vērtēt vietas pie priekšmetstikliņu malām.

DNS ķēdes pārrāvumus komētas testā var izmērīt ar neatkarīgiem beigupunktiem, piem., procentuālo DNS daļu astē, astes garumu un astes momentu [*tail moment*]. Visus trīs mērījumus var veikt, ja tiek izmantota atbilstoša attēlu analizatora programmatūras sistēma. Tomēr rezultātu izvērtēšanai un interpretēšanai ieteicams izmantot procentuālo DNS daļu astē (sauktu arī par "astes procentuālo intensitāti") (12) (40) (41) (42), kas ir DNS fragmentu intensitāte astē, izteikta kā šūnas kopējās intensitātes procentuālā daļa (13).

▼M7

Audu bojājumi un citotoksicitāte

Pozitīvi konstatējumi komētas testā ne vienmēr tiek izdarīti tikai genotoksicitātes dēļ; DNS migrācijas pieaugumu var izraisīt arī toksiskums mērķaudiem (12) (41). Savukārt zema vai vidēja citotoksicitāte bieži vien novērojama pie zināmiem genotoksīniem (12), kas liecina, ka komētas testā vien nav iespējams genotoksicitātes izraisītu DNS migrāciju nošķirt no citotoksicitātes izraisītas DNS migrācijas. Tomēr, ja tiek novērots DNS migrācijas pieaugums, ir ieteicams noskaidrot vienu vai vairākus citotoksicitātes indikatorus, jo tas var palīdzēt interpretēt konstatējumus. Ja ir skaidri pierādījumi par citotoksicitāti, DNS migrācijas pieaugums jāinterpretē piesardzīgi.

Ir izvirzīti daudzi citotoksicitātes rādītāji, un no tiem par relevantu rādītāju, kas liecina par toksiskumu audiem, uzskata histopatoloģiskās izmaiņas. Ar DNS migrācijas pieaugumu ir saistīti tādi novērojumi kā iekaisums, šūnu infiltrācija, apoptotiskas vai nekrotiskas izmaiņas, taču, kā redzams *JaCVAM* validācijas izmēģinājumā (12), nav pieejams galīgs to histopatoloģisko izmaiņu saraksts, kas vienmēr ir saistītas ar paaugstinātu DNS migrāciju. Arī klīniskās ķīmijas rādītāju (piem., *AST*, *ALT*) izmaiņas var sniegt lietderīgu informāciju par audu bojājumiem, un var apsvērt iespēju izmantot arī papildu indikatorus, piemēram, kaspāzes aktivāciju, krāsvielu *TUNEL*, krāsvielu *Annexin V* u. c. Tomēr nav daudz publicētu datu, kuros pēdējais ticis izmantots *in vivo* pētījumiem, un daži var nebūt tik ticami kā citi.

Hedgehog šūnas (jeb mākoņšūnas, rēgšūnas) ir šūnas, kuru mikroskopiskajā attēlā novērojama neliela vai neesoša galva un lielas difūzas astes un kuras tiek uzskatītas par smagi bojātām šūnām, kaut arī nav skaidrības par *Hedgehog* šūnu etioloģiju (sk. 3. papildinājumu). To izskata dēļ procentuālās DNS daļas astē mērījumi ar attēlu analīzi nav ticami, tāpēc *Hedgehog* šūnas jāizvērtē atsevišķi. *Hedgehog* šūnu sastopamība jāatzīmē un jāziņo, un jebkādi attiecīgi pieaugumi, ko varētu būt izraisījusi testējamā ķimikālija, jāizmeklē un jāinterpretē uzmanīgi. To izvērtēt var palīdzēt zināšanas par testējamo ķimikāliju iespējamo iedarbības veidu var palīdzēt.

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Eksperimenta vienība ir dzīvnieks, tāpēc tabulas veidā jāapkopo gan dati par katru dzīvnieku, gan rezultātu kopsavilkums. Datu hierarhisko īpatnību dēļ ieteicams noteikt katra priekšmetstikliņa medianālo procentuālo DNS daļu astē un aprēķināt katra dzīvnieka mediānu vidējo (12). Pēc tam, lai iegūtu grupas vidējo vērtību, nosaka atsevišķu dzīvnieku vidējo vērtību vidējos. Visas šīs vērtības jāiekļauj pārskatā. Ja tas ir zinātniski un statistiski pamatoti, drīkst izmantot alternatīvas pieejas (sk. 53. punktu). Statistisko analīzi iespējams veikt, izmantojot dažādas pieejas (58) (59) (60) (61). Izvēloties izmantojamās statistikas metodes, kā aprakstīts iepriekš atsaucēs norādītajos darbos, jāapsver nepieciešamība datus transformēt (piem., ar logaritmu vai kvadrātsakni) un/vai pieskaitīt nelielu skaitli (piem., 0,001) visām vērtībām (pat tām, kas nav nulle), lai mazinātu šādu nulles vērtību ietekmi. Sīkāka informācija par apstrādes/dzimuma mijiedarbības analīzi, ja izmanto abu dzimumu dzīvniekus, un tai sekojošo datu analīzi, kad tikušas un kad nav tikušas konstatētas atšķirības, ir sniegta 2. papildinājumā. Jāziņo arī dati par toksiskumu un klīniskajām pazīmēm.

Pieņemamības kritēriji

Testa pieņemamības pamatā ir šādi kritēriji:

a. paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē, kā aprakstīts 16. punktā,

▼M7

b. paralēlās pozitīvās kontroles (sk. 29. punktu) inducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturisko pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un izsaka statistiski ievērojamu pieaugumu salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,

c. analizējams ir bijis pietiekams skaits šūnu un devu (52. punkts un 36.–38. punkts),

d. lielākās devas izvēles kritēriji atbilst 36. punktā aprakstītajiem kritērijiem.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par vienozīmīgi pozitīvu, ja:

a. vismaz vienai no testa devām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

b. minēto palielinājumu izvērtējot ar atbilstošu trenda testu, konstatējams, ka tas saistīts ar devu,

c. kāds no rezultātiem konkrētai sugai, nesējam, ceļam, audiem un ievadīšanas reižu skaitam atrodas ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma.

Ja visi šie kritēriji ir izpildīti, testējamo ķimikāliju uzskata par spējīgu šajā testa sistēmā pētītajos audos inducēt DNS ķēdes pārrāvumus. Ja ir izpildīti tikai divi no šiem kritērijiem, sk. 62. punktu.

Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par vienozīmīgi negatīvu, ja:

a. nevienai no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli nav novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

b. ar atbilstošu trenda testu nav konstatējams ar koncentrāciju saistīts palielinājums,

c. visi rezultāti konkrētai sugai, nesējam, ceļam, audiem un ievadīšanas reižu skaitam ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās,

d. iegūti tieši vai netieši pierādījumi, kas apliecina ka notikusi mērķaudu ekspozīcija vai uz mērķaudiem atstāta toksiska ietekme.

Tādā gadījumā testējamo ķimikāliju uzskata par nespējīgu šajā testa sistēmā inducēt DNS ķēdes pārrāvumus pētītajos audos.

Nav prasības vienozīmīgi pozitīvu vai negatīvu atbildreakciju verificēt.

Ja atbildreakcija nav ne vienozīmīgi negatīva, ne vienozīmīgi pozitīva (t. i., ne visi 59. vai 60. punktā uzskaitītie kritēriji ir izpildīti) un lai palīdzētu noteikt rezultāta bioloģisko relevantumu, šie dati jānovērtē ekspertam un/vai jāveic sīkāka izskatīšana, ja tas ir zinātniski pamatoti. Var būt lietderīgi novērtēt papildu šūnas (attiecīgā gadījumā) vai veikt atkārtotu eksperimentu, iespējams, izmantojot optimizētus eksperimenta apstākļus (piem., atstatumus starp devām, citus ievadīšanas ceļus, citus paraugošanas laikus vai citus audus).

Retos gadījumos pat pēc sīkākas izskatīšanas datu kopums neļauj secināt, ka testējamā ķimikālija rada pozitīvus vai negatīvus rezultātus, un tad uzskata, tas ir neskaidrs.

▼M7

Lai novērtētu pozitīva vai neskaidra rezultāta bioloģisko relevantumu, nepieciešams iegūt informāciju par citotoksicitāti mērķaudos (sk. 54.–55. punktu). Ja pozitīvi vai neskaidri konstatējumi tiktu novēroti vienīgi gadījumos, kad ir skaidri pierādījumi par citotoksicitāti, šis pētījums tiktu pabeigts kā neskaidrs attiecībā uz genotoksicitāti, ja vien nebūtu pieejama pietiekama informācija, kas dotu pamatu izdarīt galīgu secinājumu. Ja pētījumā ar negatīvu rezultātu toksiskuma pazīmes ir pie visām testētajām devām, var būt ieteicams veikt turpmāku pētījumu ar devām, kas nav toksiskas.

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj tālāk norādītā informācija.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, ja zināms,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas ir zināms.

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.

Daudzkomponentu vielas, UVCB un maisījumi:

— ciktāl tas iespējams, raksturoti ar sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs/nesējs:

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testējamās vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma,

— preparātu sagatavošana,

— analītiskie secinājumi par preparātiem (piem., stabilitāte, homogenitāte, nominālās koncentrācijas).

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/celms un izvēles zinātniskais un ētiskais pamatojums,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barošana, bagātinājums u. c.;

— katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās, arī katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazons, vidējā vērtība un standartnovirze.

Testēšanas apstākļi:

— pozitīvās un negatīvās (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati,

▼M7

— diapazona noteikšanas testa rezultāti (ja tas veikts),

— devu līmeņa izvēles pamatojums,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas sagatavošanu,

— sīka informācija par testējamās ķimikālijas ievadīšanu,

— ievadīšanas ceļa izvēles pamatojums,

— injekcijas vieta (ja ceļš ir injicēšana zemādas audos vai intravenoza inficēšana),

— paraugu sagatavošanas metodes, ja pieejamas, histopatoloģiskās analīzes, jo īpaši ķimikālijai, kas rada pozitīvu komētas atbildreakciju,

— audu izvēles pamatojums,

— ja rezultāti ir negatīvi, metodes, kā verificēts, ka testējamā ķimikālija nonākusi mērķaudos vai vispārējā asinsritē,

— faktiskā deva (mg uz vienu kg ķermeņa svara dienā), kas aprēķināta pēc testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzeramajā ūdenī un pēc uzņemtā daudzuma (attiecīgā gadījumā),

— sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apstrādes un paraugošanas grafiku apraksts un izvēles pamatojums (piem., toksikokinētiskie dati, ja pieejami),

— atsāpināšanas, analgēzijas metode,

— eitanāzijas metode,

— audu izolēšanas un saglabāšanas procedūras,

— atsevišķu šūnu/kodolu suspensijas sagatavošanas metodes,

— visu reaģentu avots un sērijas numurs (ja pieejams),

— citotoksicitātes izvērtēšanas metodes,

— elektroforēzes apstākļi,

— izmantotās iekrāsošanas metodes un

— "komētu" uzskaitīšanas un mērīšanas metodes.

Rezultāti:

— vispārēji klīniskie novērojumi, ja tādi veikti, katram dzīvniekam pirms testa perioda un visā tā laikā,

— pierādījumi par citotoksicitāti (attiecīgā gadījumā),

▼M7

— pētījumiem, kuri pārsniedz nedēļu: katra dzīvnieka svars testa sākumā un beigās, arī katras grupas dzīvnieku ķermeņa svara diapazons, vidējā vērtība un standartnovirze; pārtikas patēriņš;

— ja novērojama, devas–atbildreakcijas sakarība,

— par katriem audiem/dzīvnieku — procentuālā DNS daļa astē (vai citi rādītāji, ja tādi izraudzīti) un katra priekšmetstikliņa mediāna, katra dzīvnieka vidējā vērtība un katras grupas vidējās vērtības;

— katram no izvērtētajiem audu veidiem — paralēlo un vēsturisko negatīvo kontroļu dati ar diapazoniem, vidējām vērtībām / mediānām un standartnovirzēm,

— paralēlo un vēsturisko pozitīvo kontroļu dati,

— ja audi nav aknas — devas–atbildreakcijas līkne, izmantojot pozitīvo kontroli. To var iegūt no datiem, kas iegūti kompetences pierādīšanas laikā (sk. 16.–17. punktu), un tai, atsaucoties uz esošo literatūru, jāpievieno pamatojums, ka attiecīgo audu kontrolēs ir pienācīga atbildreakciju intensitāte un izkliede,

— izmantotās statistiskās analīzes un metodes, un kritēriji, pēc kuriem atbildreakciju uzskata par pozitīvu, negatīvu vai neskaidru,

— *Hedgehog* šūnu biežums katrā grupā un katram dzīvniekam.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

Atsauces

LITERATŪRAS SARAKSTS

(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) Šā pielikuma B.8. nodaļa "*Subakūtais inhalācijas toksiskums: 28 dienu pētījums*"

(51) Šā pielikuma B.29. nodaļa "*Subhroniskais inhalācijas toksiskums: 90 dienu pētījums*"

(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", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Atsevišķu šūnu gēla elektroforēze sārmainā vidē: jutīgs paņēmiens primāro DNS bojājumu noteikšanai atsevišķas šūnas/kodola līmenī.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

"Komēta": veidols, ko nukleoīdi ieņem pēc ievietošanas vienā elektroforēzes laukā un kas līdzinās komētai — galva ir kodols, bet asti veido DNS, kas elektriskajā laukā migrē prom no kodola.

Izšķirīgi svarīgs mainīgais/parametrs: protokola mainīgais, kura nelielas izmaiņas var atstāt lielu ietekmi uz testa iznākumu. Izšķirīgi svarīgi mainīgie var būt audiem specifiski. Izšķirīgi svarīgus mainīgos nedrīkst mainīt, jo īpaši testa laikā, neapsverot to, kā šīs izmaiņas mainīs testa atbildreakciju, par ko liecina, piemēram, intensitāte un mainība pozitīvajās un negatīvajās kontrolēs. Testēšanas pārskatā jāuzskaita izšķirīgi svarīgu mainīgo izmaiņas, kas izdarītas testēšanas laikā vai salīdzinājumā ar laboratorijas standartprotokolu, un katra izmaiņa jāpamato.

Astes intensitāte jeb procentuālā DNS daļa astē: komētas astes intensitāte attiecībā pret kopējo intensitāti (galva plus aste). Tā atspoguļo DNS pārrāvumu apmēru, kas izteikts procentos.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kura ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼M7

2. papildinājums

FAKTORIĀLAIS PLĀNS DZIMUMATŠĶIRĪBU IDENTIFICĒŠANAI KOMĒTAS *IN VIVO* TESTĀ

Faktoriālais plāns un tā analīze

Saskaņā ar šo plānu pie katra koncentrācijas līmeņa testē vismaz 5 tēviņus un 5 mātītes, tātad plānā tiek izmantoti vismaz 40 dzīvnieki (20 tēviņi un 20 mātītes un attiecīgās pozitīvās kontroles).

Šis plāns ir viens no vienkāršajiem faktoriālajiem plāniem un ir līdzvērtīgs dispersijas divfaktoru analīzei, kur galvenie aplūkotie efekti ir dzimuma un koncentrācijas līmeņa efekti. Šos datus var analizēt, izmantojot daudzas statistikas programmatūras standartpaketes, piem., *SPSS*, *SAS*, *STATA*, *Genstat*, kā arī izmantojot *R*.

Šajā analīzē datu kopas dispersiju sadala dispersijā, kas saistīta ar dzimumu, dispersijā, kas saistīta ar koncentrāciju, un dispersijā, kas saistīta ar dzimumu un koncentrāciju mijiedarbību. Katru no šiem locekļiem salīdzina ar aplēsto dispersiju starp replikātdzīvniekiem viena dzimuma dzīvnieku grupās pie vienas un tās pašas koncentrācijas. Pilnīga informācija par pamatā esošo metodoloģiju pieejama daudzās standarta statistikas mācību grāmatās (sk. atsauces) un statistiskajās paketēs pieejamajos palīgrīkos.

Analīzi turpina, *ANOVA* tabulā [1] apskatot mijiedarbības locekli "dzimums x koncentrācija". Ja mijiedarbības loceklis nav nozīmīgs, visu dzimumu vai visu koncentrācijas līmeņu apkopotās vērtības ļauj veikt derīgus starplīmeņu statistikas testus, pamatojoties uz *ANOVA* grupā apkopotās dispersijas locekli.

Analīzi turpina, dažādām koncentrācijām aplēsto dispersiju sadalot kontrastos, tādējādi iegūstot lineārus un kvadrātiskus atbildreakciju kontrastus visiem koncentrācijas līmeņiem. Ja mijiedarbības loceklis "dzimums x koncentrācija" ir nozīmīgs, arī šo locekli var sadalīt mijiedarbības kontrastos "lineārais loceklis x dzimums" un "kvadrātloceklis x dzimums". Šie locekļi ļauj pārbaudīt, vai koncentrāciju atbildreakcijas abiem dzimumiem ir paralēlas vai katram dzimumam ir atšķirīga atbildreakcija.

Grupā apkopotās dispersijas aplēsi var izmantot, lai pārveida testos testētu vidējo vērtību starpību. Šos salīdzinājumus var veikt starp abu dzimumu vidējām vērtībām un starp dažādu koncentrācijas līmeņu vidējām vērtībām, piem., salīdzinājumiem ar negatīvās kontroles līmeņiem. Nozīmīgas mijiedarbības gadījumos iespējams veikt salīdzinājumus starp dažādu koncentrāciju vidējām vērtībām viena dzimuma ietvaros vai abu dzimumu vidējām vērtībām pie vienādas koncentrācijas.

Atsauces

Ir daudz statistikas mācību grāmatu, kurās apspriesta faktoriālo plānu teorija, struktūra, metodoloģija, analīze un interpretācija diapazonā no vienkāršākajām divfaktoru analīzēm un līdz sarežģītākām formām, ko izmanto eksperimentu plānošanas metodoloģijā. Tālāk sniegtais saraksts nav izsmeļošs. Dažās grāmatās sniegti izstrādāti salīdzināmu plānu piemēri, un dažos gadījumos norādīts kods analīžu veikšanai ar dažādām programmatūras paketēm.

[1] Statistiķi, kuri izmanto modelēšanas pieeju, piemēram, *General Linear Models* (*GLM*), var veikt analīzi citādā, bet salīdzināmā veidā, taču ne vienmēr sastādīs ierasto *ANOVA* tabulu, kuru sāka izmantot, kad vēl pirmsdatorizācijas laikmetā statistiskajiem aprēķiniem izmantoja algoritmiskas pieejas.

▼**M7**

(1) 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.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) 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.

(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 Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

3. papildinājums

PAŠREIZĒJIE TESTA IEROBEŽOJUMI

Ņemot vērā pašreizējās zināšanas, ar komētas *in vivo* testu ir saistīti vairāki ierobežojumi. Paredzams, ka šie ierobežojumi tiks samazināti vai precizēti, augot pieredzei ar testa izmantošanu tam, lai sniegtu atbildes uz jautājumiem par drošumu normatīvā kontekstā.

1. Daži DNS bojājumu veidi var būt īslaicīgi, t. i., reparācija var notikt pārāk ātri, lai 24 stundas vai ilgāk pēc pēdējās devas tos varētu novērot. Nav ne konkrēta saraksta ar īslaicīgu bojājumu veidiem, ne saraksta ar ķimikālijām, kuras ticami varētu izraisīt šāda veida bojājumu, un nav arī zināms, cik ilgi šāda veida bojājumus iespējams detektēt. Optimālais(-ie) paraugošanas laiks(-i) var būt specifiski arī ķimikālijai vai ievadīšanas ceļam, un paraugošanas laiki jānosaka, ņemot vērā kinētiskos datus (piem., laiku T_{max}, kad tiek sasniegta maksimālā koncentrācija plazmā vai audos), ja tādi dati ir pieejami. Lielākā daļa validācijas pētījumu, uz kurām balstās šī testēšanas metode, norādīja uz autopsiju 2 vai 3 stundas pēc galīgās devas ievadīšanas. Publicētajā literatūrā vairums pētījumu norāda uz galīgās devas ievadīšanu 2–6 stundas pirms nonāvēšanas. Tāpēc šīs pieredzes tika izmantotas kā pamats testēšanas metodē iekļautajam ieteikumam galīgo devu ievadīt konkrētā laikpunktā 2–6 stundas pirms autopsijas, ja vien nav datu, kas liecinātu par citu ieteicamo laiku.

2. Nav konstatēti pētījumu dati, kas izvērtētu testa jutību attiecībā uz īslaicīgu DNS bojājumu detektēšanu pēc ievadīšanas ar barību vai dzeramo ūdeni salīdzinājumā ar ievadīšanu ar gavāžu. DNS bojājumi ir detektēti pēc ievadīšanas ar barību un dzeramo ūdeni, bet tādu ziņojumu ir salīdzinoši maz salīdzinājumā ar daudz plašāko pieredzi gavāžas un intraperitoneālas ievadīšanas jomā. Līdz ar to testa jutība var būt mazāka attiecībā uz ķimikālijām, kuras inducē īslaicīgus bojājumus un kuras ievadītas ar barību vai dzeramo ūdeni.

3. Nav veikti starplaboratoriju pētījumi ar audiem, kas nav aknas un kuņģis, tāpēc nav nekādu ieteikumu par to, kā panākt jutīgu un reproducējamu atbildreakciju audos, kas nav aknas, piem., paredzamos pozitīvo un negatīvo kontroļu diapazonus. Attiecībā uz aknām nebija iespējams panākt vienošanos par zemākas robežas noteikšanu negatīvās kontroles vērtībai.

4. Kaut arī vairākas publikācijas apliecina citotoksicitātes *in vitro* maldinošo ietekmi, ir publicēts ļoti maz datu par *in vivo* pētījumiem, tāpēc nav iespējams ieteikt nevienu atsevišķu citotoksicitātes pasākumu. Ar DNS migrācijas pieaugumu ir saistītas tādas histopatoloģiskās izmaiņas kā iekaisums, šūnu infiltrācija, apoptotiskas vai nekrotiskas izmaiņas, taču, kā redzams *JaCVAM* validācijas izmēģinājumā (ESAO, 2014), šīs izmaiņas ne vienmēr noved pie pozitīviem konstatējumiem komētas testā, līdz ar to nav pieejams galīgs tādu histopatoloģisko izmaiņu saraksts, kas vienmēr būtu saistītas ar paaugstinātu DNS migrāciju. Par citotoksicitātes rādītāju iepriekš ierosināts izmantot *Hedgehog* šūnas (jeb mākoņšūnas, rēgšūnas), taču nav skaidrības par *Hedgehog* šūnu etioloģiju. Pastāv dati, kas liecina, ka tās var izraisīt ar ķimikāliju saistīta citotoksicitāte, mehāniski / fermenta inducēti bojājumi, kas iniciēti parauga sagatavošanas laikā (*Guerard et al*., 2014), un/vai spēcīgāka testējamās ķimikālijas genotoksiskā ietekme. Citi dati norāda, ka tās rodas ekstensīvu bet, iespējams, reparējamu DNS bojājumu dēļ (*Lorenzo et al*., 2013).

▼M7

5. Audi vai šūnu kodoli ir tikuši sekmīgi sasaldēti vēlākai analizēšanai. Parasti tas rada izmērāmu ietekmi uz nesēja un pozitīvās kontroles atbildreakciju (*Recio et al.,* 2010; *Recio at al.*, 2012; *Jackson at al.*, 2013). Ja to izmanto, laboratorijai jādemonstrē kompetence sasaldēšanas metodoloģijās un jāpārliecinās par pieņemami zemiem procentuālās DNS daļas astē diapazoniem to dzīvnieku mērķaudos, kas apstrādāti ar nesēju, un jāpārliecinās, ka joprojām iespējams detektēt pozitīvas atbildreakcijas. Literatūrā ir aprakstītas dažādas audu sasaldēšanas metodes. Tomēr patlaban nav vienprātības par to, kā audus sasaldēt un atkausēt vislabāk un kā novērtēt, vai iespējami mainīta atbildreakcija var ietekmēt testa jutību.

6. Nesenie darbi liecina, ka izšķirīgi svarīgi mainīgo saraksts arī turpmāk varētu sarukt un ka izšķirīgi svarīgi mainīgo parametri tiks precizēti (*Guerard et al*., 2014).

Atsauces

(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. **REPRODUKTĪVĀS / ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 421 (2016). ESAO vadlīnijas par ķimikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 421 par skrīninga testu tika pieņemta 1995. gadā, pamatojoties uz protokolu par "Sākotnējo reproduktīvā toksiskuma skrīninga testu", kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).

2. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sākta prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (3), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Piemēram, ESAO *TG* Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem, šā pielikuma B.7. nodaļa) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķimikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 421 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.

3. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 421, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (4).

4. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķimikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Šo skrīninga testa metodi var izmantot, lai iegūtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz reprodukciju un/vai attīstību vai nu ķimikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķimikālijām, kas rada bažas. To var izmantot arī kā daļu no sākotnējo skrīninga testu kopuma attiecībā uz esošajām ķimikālijām, par kurām pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, vai kā devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontoģenēzes pētījumiem; to var izmantot citos relevantos gadījumos. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (5).

▼M8

6. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatālās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Ņemot vērā dzīvnieku salīdzinoši mazo skaitu devas grupās, beigupunktu selektivitāti, pētījuma īso ilgumu un citus iemeslus, šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.

7. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķimikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (6) kontekstā. Atjauninātā ESAO *TG* Nr. 421 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķimikālija ir endokrīnais disruptors.

8. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.

9. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

10. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

11. Testējamo ķimikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķimikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt precīzs testikulārās toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilgais pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatoģenēzi.

12. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).

13. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].

▼M8

14. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa periodā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

15. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā testēšanas metodē noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar ESAO *TG* Nr. 407 (šā pielikuma B.7. nodaļa) tika izmantotas tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

16. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Telpā, kurā tur izmēģinājuma dzīvniekus, jābūt 22 ° C (± 3 ° C) temperatūrai. Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams nepārsniegt 70 %, jāorientējas uz 50–60 %. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā.

17. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.

18. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

19. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala kontrolgrupās un apstrādes grupas. Būrus izvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

20. Testējamo ķimikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķimikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķimikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.

▼M8

21. Ja vajadzīgs, testējamo ķimikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/emulsiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķimikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

22. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūsno mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas.

Devas

23. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Devu līmeņus var noteikt, pamatojoties uz informāciju, kas iegūta akūta toksiskuma testos, vai atkārtotas devas pētījumu rezultātiem. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķimikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.

24. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai smagas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama (*NOAEL*). Devu līmeņu noteikšanai to samazinājuma virzienā optimums bieži vien ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

25. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

26. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai — ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni — līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī, un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks perorālās devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tādus kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā koncentrācija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķimikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

▼M8

Devu došana

27. Dzīvnieki testējamās ķimikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķimikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādus ūdens šķīdumus, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķimikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.

28. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķimikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākoriģē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu.

Eksperimenta grafiks

29. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot vismaz 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.

30. Vecākpaaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.

31. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Pārošanas procedūra

32. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir neveiksmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

▼M8

Metiena lielums

33. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazuļus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuļi atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem mazuļiem jāņem asins paraugi, kurus apkopo un izmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anoģenitālā attāluma (*AGD*), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuļi, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja koriģēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuļi vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

34. Ja metiena lielums netiek koriģēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

NOVĒROJUMI DZĪVES LAIKĀ

Klīniskie novērojumi

35. Visā testa periodā vismaz reizi dienā jāizdara klīniskie novērojumi; ja ir novērotas toksiskuma pazīmes, tie jāizdara biežāk. Klīniskie novērojumi katru dienu jāizdara, vēlams, vienā un tajā pašā laikā vai laikos, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas. Jāreģistrē acīm redzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās pazīmes un visas toksiskuma pazīmes, kā arī mirstība. Šajos datos jāiekļauj toksiskuma pazīmju parādīšanās laiks, pakāpe un ilgums.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

36. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

37. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar dzirdināmo ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 22. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa

▼M8

dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu novērošanu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jārūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (7) (8).

Pēcnācēju parametri

39. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.

40. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāsaskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus 35. punktā aprakstītajiem novērojumiem jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.

41. Katra mazuļa *AGD* jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (9). Kā ieteikts ESAO *GD* 151 (10), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāsaskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Klīniskā bioķīmija

42. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

— 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 33.–34. punktu),

— pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un

— pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugos, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

43. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

— nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.

▼M8

44. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.

Patoloģija

Makroskopiskā autopsija

45. Tūlīt pēc nonāvēšanas vai nāves, kas iestājusies pētījuma laikā, pieaugušie dzīvnieki makroskopiski jāpārbauda attiecībā uz anomālijām vai patoloģiskām pārmaiņām. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar olnīcu histopatoloģiju, vaginālās uztriepes jāizmeklē autopsijas dienas rītā.

46. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpļa cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas.

47. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamas acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes. 13. dienā jāsaglabā vairogdziedzeris, kas izņemts no 1 vīrišķā un 1 sievišķa dzimuma mazuļa katrā metienā.

48. Jāsaglabā visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata, sēklas pūslīši un prostatas priekšējās daivas), vairogdziedzeris un visi orgāni, kam ir redzami makroskopiski bojājumi. Sēklinieku un sēklinieku piedēkļu parastai pārbaudei nav ieteicams izmantot formalīna fiksāciju. Attiecībā uz šiem audiem pieņemama metode ir izmantot Buēna fiksatoru vai modificētu Davidsona fiksatoru (11). Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu.

Histopatoloģija

49. Veic lielākās devas grupas dzīvnieku un kontrolgrupas dzīvnieku olnīcu, sēklinieku un sēklinieku piedēkļu detalizētu histopatoloģisku izmeklēšanu (īpašu uzsvaru liekot uz sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras spermatoģenēzi un histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt pārējos saglabātos mazuļu un pieaugušo dzīvnieku orgānus, arī vairogdziedzeri. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no piegulošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Ja lielākās devas grupā ir novērotas pārmaiņas, minētās izmeklēšanas jāveic arī citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (11) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.

▼M8

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

50. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai humānās nonāvēšanas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsno mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.

51. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reproduktīvajiem beigupunktiem. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas. *AGD* un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Ņemot vērā grupu mazo lielumu, pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskos kontroles datus (piemēram, datus par metiena lielumu), ja tādi ir pieejami.

Rezultātu izvērtēšana

52. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķimikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reproduktīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.

53. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reproduktīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontoģenēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.

54. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

55. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

▼**M8**

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,

— katra dzīvnieka masa testa sākumā,

— sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

— ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,

— barības patēriņš un ūdens patēriņš (ja šādi dati ir pieejami),

— dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,

— gestācijas ilgums,

— toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,

— klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),

— pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,

— dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,

— mazuļu ķermeņa masas dati,

— visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),

▼M8

— zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,

— vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),

— to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,

— nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,

— implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,

— ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,

— autopsijas konstatējumi,

— histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,

— absorbcijas dati (ja pieejami),

— rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

Rezultātu interpretēšana

56. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu (sk. 5. un 6. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniedz norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (12). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (11) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo *TG*.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) 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), Organisation for Economic Cooperation and Development,.- Paris.

▼**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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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 (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ ESAO *GD 150 (6))*

Androgenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17ß) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, $T_{3)}$ darbību.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte: reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenatāliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķimikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķimikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte: nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme).

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17ß).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

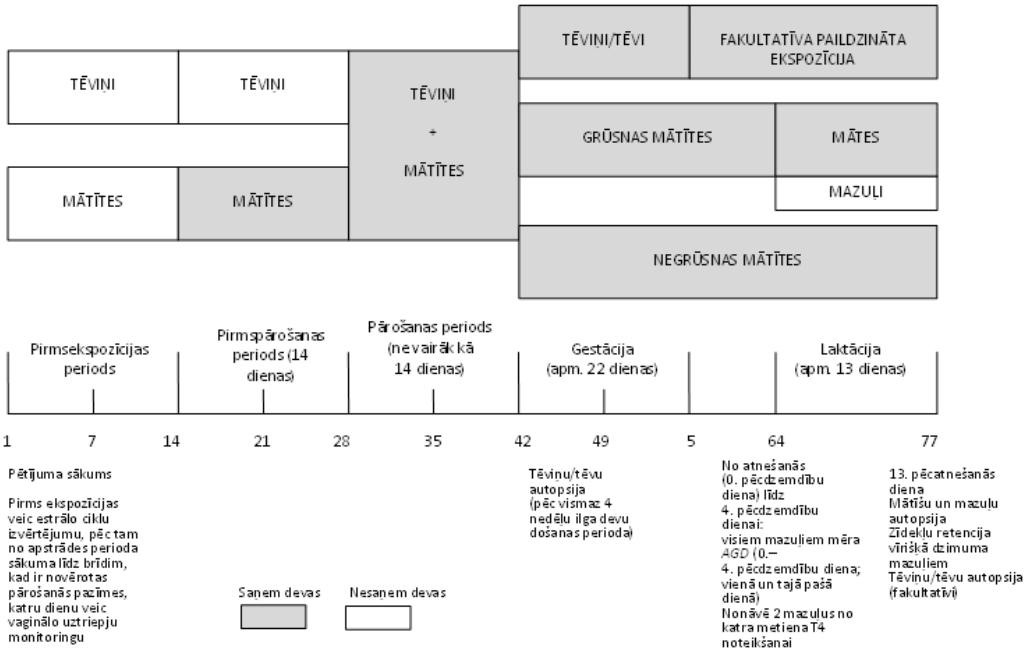
Tireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, $T_{3)}$.

Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

▼**M8**

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS



▼**M8**

3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6–...[1] (N)					
Grūsnība ≤ 21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem 4. dienā pēc dzemdībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)					
Mazuļu masa *AGD* mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					

▼**M8**

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Mazuļu *AGD* tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem 13. dienā (vidēji)					
Metiena masa 13. dienā (vidēji)					
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM					
Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa					
Mātes ar 1 šādu mazuli					
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem					
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI					
Prenatāli / pēc implantācijām (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					

([1]) pārošanas perioda pēdējā diena

▼M8

B.64. KOMBINĒTS ATKĀRTOTAS DEVAS TOKSISKUMA PĒTĪJUMS AR REPRODUKTĪVĀS/ONTOĢENĒTISKĀS TOKSICITĀTES SKRĪNINGA TESTU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 422 (2016). ESAO vadlīnijas par ķimikāliju testēšanu periodiski tiek pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Sākotnējā vadlīnija Nr. 422 par skrīninga testu tika pieņemta 1996. gadā, pamatojoties uz protokolu par "Kombinēto atkārtotas devas un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testu", kas apspriests divās ekspertu sanāksmēs Londonā 1990. gadā (1) un Tokijā 1992. gadā (2).

2. Šī testēšanas metode apvieno reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga daļu, kuras pamatā ir pieredze, kas gūta dalībvalstīs, izmantojot sākotnējo metodi ar lielā apjomā ražotām esošajām ķimikālijām, un pieredze, kas gūta izpētes testos ar pozitīvās kontroles vielām (3) (4), un atkārtotas devas toksiskuma daļu saskaņā ar ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 407 (Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem), kura atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai.

3. Pēc tam, kad 1998. gadā ESAO tika sākta prioritāra darbība ar mērķi pārskatīt esošās testēšanas vadlīnijas un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par endokrīno disruptoru skrīningu un testēšanu (5), šī testēšanas metode tika atjaunināta, iekļaujot tajā endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus. Šajā kontekstā *TG* Nr. 407 (kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) 2008. gadā tika papildināta ar parametriem, kas piemēroti testējamo ķimikāliju endokrīnās aktivitātes noteikšanai. *TG* Nr. 422 tika atjaunināta, lai skrīninga *TG*, kur ekspozīcijas periodi aptver dažus jutīgos attīstības periodus (prenatālais vai agrīns postnatālais periods), iekļautu dažus endokrīnajiem disruptoriem relevantus beigupunktus.

4. Izvēlētie endokrīnajiem disruptoriem relevantie papildu beigupunkti, kas ir daļa arī no *TG* Nr. 443 (Paplašinātais vienas paaudzes reproduktīvās toksicitātes pētījums, šā pielikuma B.56. nodaļa), tika iekļauti *TG* Nr. 422, pamatojoties uz priekšizpēti, kurā aplūkoti zinātniski un tehniski jautājumi par minēto beigupunktu iekļaušanu, kā arī iespējamie testēšanas plānojuma pielāgojumi, kas vajadzīgi minēto beigupunktu iekļaušanai (6).

5. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai iegūtu ierobežotu informāciju par testējamās ķimikālijas ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām. Tā nav nedz alternatīva B.31., B.34., B.35. vai B.56. testēšanas metodei, nedz tās aizstāj.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Novērtējot un izvērtējot testējamās ķimikālijas toksiskās īpašības, orālo toksicitāti ar atkārtotām devām var noteikt pēc tam, kad akūtās toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Šis pētījums sniedz informāciju par iespējamajiem veselības apdraudējumiem, kas varētu rasties no atkārtotas ekspozīcijas relatīvi ierobežotā laikposmā. Metodē ietilpst atkārtotas devas toksiskuma pamatpētījums, ko var izmantot attiecībā uz ķimikālijām, par kurām nav pamatoti veikt 90 dienu pētījumu (piemēram, ja ražošanas apjoms nepārsniedz noteiktas robežvērtības), vai par provizorisku pētījumu ilgtermiņa pētījumam. Veicot pētījumu, ir jāievēro galvenie principi un apsvērumi, kas noteikti ESAO norādījumu dokumentā Nr. 19 par klīnisko pazīmju atpazīšanu, novērtēšanu un izmantošanu par humānajiem beigupunktiem eksperimenta dzīvniekiem, kurus izmanto drošības novērtējumā (7).

▼**M8**

7. Šī metode ietver arī reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testu, un tāpēc to var izmantot arī, lai sniegtu sākotnējo informāciju par iespējamo ietekmi uz tēviņu un mātīšu reproduktīvo spēju, piemēram, gonadālo funkciju, pārošanās uzvedību, apaugļošanos, miesas augļa attīstību un dzemdībām, vai nu ķimikāliju toksikoloģisko īpašību novērtēšanas agrīnā posmā, vai par ķimikālijām, kas rada bažas. Šī testēšanas metode nesniedz pilnīgu informāciju par visiem reprodukcijas un attīstības aspektiem. Konkrētāk, tā piedāvā tikai ierobežotus līdzekļus, ar ko detektēt prenatālās ekspozīcijas postnatālās izpausmes vai ietekmi, kas var rasties postnatālās ekspozīcijas laikā. Beigupunktu selektivitātes, pētījuma īsā ilguma un citu iemeslu dēļ šī metode nesniedz pierādījumus galīgajiem apgalvojumiem par reproduktīvās/ontoģenētiskās ietekmes neesību. Turklāt, ja nav datu no citiem reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku.

8. Rezultāti, kas iegūti par endokrīnajiem parametriem, ir jāaplūko ESAO endokrīni disruptīvu ķimikāliju testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara (8) kontekstā. Atjauninātā ESAO *TG* Nr. 422 ir iekļauta minētā konceptuālā satvara 4. līmenī, kur ietilpst *in vivo* testi, kas sniedz datus par nelabvēlīgu ietekmi uz endokrīnajiem beigupunktiem. Endokrīnu signālu pašu par sevi tomēr nevar uzskatīt par pietiekamu pierādījumu tam, ka testējamā ķimikālija ir endokrīnais disruptors.

9. Šajā testēšanas metodē uzsvars likts arī uz neiroloģisko ietekmi kā īpašu beigupunktu un uzsvērta vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami daudz informācijas. Ar šo metodi jāidentificē ķimikālijas ar neirotoksisku potenciālu, saistībā ar kuru varētu būt pamatoti veikt turpmāku padziļinātu izpēti. Turklāt metode var dot arī pamatnorādes uz imunoloģisko ietekmi.

10. Ja nav datu no citiem sistēmiskās toksicitātes, reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes, neirotoksicitātes un/vai imūntoksicitātes pētījumiem, pozitīvie rezultāti ir noderīgi sākotnējai bīstamības novērtēšanai un palīdz pieņemt lēmumus par papildu testēšanas nepieciešamību un laiku. Tests var būt īpaši noderīgs kā daļa no ESAO skrīninga informācijas datu kopas (*SIDS*), lai novērtētu esošās ķimikālijas, par kurām ir pieejams maz toksikoloģiskās informācijas vai tā nav pieejama vispār, un tas var kalpot par alternatīvu divu atsevišķu testu, proti, atkārtotas devas toksiskuma testa (ESAO *TG* Nr. 407, kas atbilst šā pielikuma B.7. nodaļai) un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes testa (ESAO *TG* Nr. 421, kas atbilst šā pielikuma B.63. nodaļai) veikšanai. To var izmantot arī par devu diapazona noteikšanas pētījumu plašākiem reprodukcijas/ontoģenēzes pētījumiem vai citos relevantos gadījumos.

11. Parasti tiek pieņemts, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība atšķiras. Tāpēc šajā kombinētajā testā var būt grūti noteikt devu līmeņus, kas ir pietiekami gan vispārējas sistēmiskas toksicitātes, gan specifiskas reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes izvērtēšanai; to vieglāk izdarīt, ja individuālos testus veic atsevišķi. Turklāt testa rezultātus attiecībā uz vispārējo sistēmisko toksicitāti var būt sarežģītāk interpretēt nekā tad, ja veic atsevišķu atkārtotas devas pētījumu, jo īpaši gadījumos, kad seruma un histopatoloģijas parametri pētījumā netiek izvērtēti vienlaicīgi. Šo tehnisko sarežģījumu dēļ šā kombinētā

▼M8

skrīninga testa veikšanai ir vajadzīga liela pieredze toksicitātes testēšanā. No otras puses, papildus tam, ka testā tiek izmantots mazāks skaits dzīvnieku, kombinētais tests var nodrošināt labāku veidu, kā tiešo ietekmi uz reprodukciju/ontoģenēzi nošķir no ietekmes, kas ir sekundāra citiem (sistēmiskas) ietekmes veidiem.

12. Šajā testā devu došanas periods ir ilgāks nekā parastā 28 dienu ilgā atkārtotas devas pētījumā. Tomēr salīdzinājumā ar situāciju, kad papildus reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes skrīninga testam tiek veikts 28 dienu ilgs atkārtotas devas pētījums, šajā testā katrā grupā tiek izmantots mazāks skaits katra dzimuma dzīvnieku

13. Šajā testēšanas metodē izmanto perorālo testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Citu ekspozīcijas ceļu izmantošanas gadījumā var būt vajadzīgas modifikācijas.

14. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

15. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

16. Testējamo ķimikāliju pakāpeniski pieaugošās devās saņem vairākas tēviņu un mātīšu grupas. Tēviņiem testējamās ķimikālijas jādod vismaz četras nedēļas līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot); minētais laikposms aptver vismaz divas nedēļas pirms pārošanas, pārošanas periodu un aptuveni divas nedēļas pēc pārošanas. Ņemot vērā ierobežoto pirmspārošanas devu došanas periodu tēviņiem, auglība var nebūt īpaši precīzs testikulārās toksicitātes rādītājs. Tāpēc būtiska ir sēklinieku detalizēta histopatoloģiska izmeklēšana. Divu nedēļu ilgais pirmspārošanas devu došanas periods apvienojumā ar turpmākiem pārošanās/auglības novērojumiem ar kopējo devu došanas periodu vismaz četras nedēļas, kam seko tēviņu gonādu detalizēta histopatoloģija, tiek uzskatīts par pietiekamu, lai varētu noteikt lielāko daļu ietekmes uz tēviņu auglību un spermatoģenēzi.

17. Mātītēm devas dod visu pētījuma laiku, kas aptver divas nedēļas pirms pārošanas (aptverot divus pilnus estrālos ciklus), laiku līdz apaugļošanās brīdim, grūsnības laiku un vismaz trīspadsmit dienas pēc dzemdībām, līdz dienai pirms plānotās nonāvēšanas (minēto dienu ieskaitot).

18. Pētījuma ilgums pēc aklimatizācijas un estrālā cikla izvērtējuma, ko veic pirms devu došanas, ir atkarīgs no mātīšu rādītājiem un ir aptuveni 63 dienas [vismaz 14 dienas pirms pārošanas, (ne vairāk kā) 14 dienas pārošana, 22 dienas gestācija, 13 dienas laktācija].

19. Devu došanas perioda laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksiskuma pazīmes. Dzīvniekiem, kas testa laikā nobeigušies vai ir nonāvēti, izdara autopsiju, un izdzīvojušos dzīvniekus testa beigās nonāvē un tiem izdara autopsiju.

▼M8

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izraudzīšanās

20. Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar žurkām. Ja šajā *TG* Nr. 422 noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīno disruptoru detektēšanai saskaņā ar *TG* Nr. 407 izmantoja tikai žurkas. Nedrīkst izmantot līnijas ar zemu auglību vai līnijas, par kurām ir labi zināms, ka tām ir bieži sastopami attīstības defekti. Jāizmanto veselīgi iepriekš nepāroti dzīvnieki, kuriem eksperimentālas procedūras iepriekš nav veiktas. Jānorāda testa dzīvnieku suga, līnija, dzimums, masa un vecums. Pētījuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi. Ja pētījumu veic kā sākotnēju pētījumu ilgtermiņa pētījumam vai pētījumam, kas aptver visu paaudzi, vēlams abos pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

21. Visām procedūrām jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °). Relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, vēlams, ne augstākam par 70 %, izņemot telpu uzkopšanas laiku. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzirdināmajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība tam piemaisīt testējamo ķimikāliju, ja ķimikāliju ievada šādā ceļā.

22. Dzīvniekus ieteicams turēt mazās viendzimuma grupās; ja tas zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Ja dzīvniekus tur grupās, dzīvnieku skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5. Pārošanas procedūras jāveic attiecīgajam nolūkam piemērotos būros. Grūsnas mātītes jātur atsevišķi, un tām jānodrošina migas ierīkošanai vajadzīgie materiāli. Mātītes laktācijas periodā tiks turētas atsevišķi kopā ar to pēcnācēju.

23. Barība regulāri jāanalizē, lai noteiktu kontaminantu klātbūtni. Barības paraugs jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

24. Veselīgus jaunus pieaugušus dzīvniekus nejaušināti iedala apstrādes grupās un ievieto būros. Būri jāizvieto tā, lai būru novietojuma varbūtējā ietekme būtu iespējami maza. Dzīvniekus unikāli identificē un pirms pētījuma sākšanas vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

25. Testējamo ķimikāliju ieteicams ievadīt perorāli, ja vien par piemērotākiem netiek uzskatīti citi ievadīšanas ceļi. Ja izvēlēts perorālais ievadīšanas ceļš, testējamo ķimikāliju parasti ievada ar gavāžu; tomēr testējamo ķimikāliju var ievadīt arī ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni.

26. Ja vajadzīgs, testējamo ķimikāliju izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējā. Kad vien iespējams, ieteicams lietošanai izvēlēties ūdens šķīdumu/suspensiju vai, ja tas nav iespējams, šķīdumu/suspensiju eļļā (piemēram, kukurūzas eļļā), vai, ja arī tas nav iespējams, šķīdumu citos nesējos. Ja nesējs nav ūdens, ir jāzina šā nesēja toksiskās īpašības. Jānosaka testējamās ķimikālijas stabilitāte un homogenitāte nesējā.

▼M8

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

27. Ieteicams, lai katrā grupā sākumā būtu vismaz 10 tēviņi un 12–13 mātītes. Pirms ekspozīcijas izvērtē mātīšu estrālos ciklus, un dzīvniekus, kam nav novērojami tipiski 4–5 dienu cikli, pētījumā neiekļauj; tāpēc ieteicams izmantot lielāku skaitu mātīšu, lai katrā grupā būtu 10 mātītes. Izņemot izteiktas toksiskās ietekmes gadījumus, sagaidāms, ka katrā grupā būs vismaz 8 grūsnas mātītes, kas parasti ir minimālais pieļaujamais grūsno mātīšu skaits grupā. Mērķis ir nodrošināt pietiekamu daudzumu grūsnu mātīšu un pietiekamu daudzumu pēcnācēju, lai varētu ticami izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju ietekmēt auglību, grūsnību, mātišķo uzvedību un zīdīšanu, kā arī F_1 pēcnācēju augšanu un attīstību no aizmešanās līdz 13. dienai pēc piedzimšanas. Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana pētījuma gaitā, skaits jāpalielina par dzīvnieku skaitu, ko paredzēts nonāvēt pirms pētījuma pabeigšanas. Jāapsver papildu satelītgrupas (pieci dzīvnieki no katra dzimuma) iekļaušana kontrolgrupā un lielākās devas grupā, lai vismaz 14 dienas pēc apstrādes novērotu sistēmiskas toksiskās ietekmes atgriezeniskumu, noturību vai vēlīnu parādīšanos. Satelītgrupas dzīvniekus nepāro un līdz ar to neizmanto reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes novērtēšanai.

Devas

28. Parasti jāizmanto vismaz trīs testa grupas un kontrolgrupa. Ja piemēroti vispārējās toksicitātes dati nav pieejami, var izdarīt diapazona noteikšanas pētījumu (ar vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem), kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārīkojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, izņemot attiecībā uz testējamās ķimikālijas ievadīšanu. Ja testējamās ķimikālijas ievadīšanai izmanto nesēju, kontrolgrupa saņem lielāko izmantoto nesēja daudzumu.

29. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā visus pieejamos toksiskuma un (toksiko)kinētiskos datus. Jāņem vērā arī tas, ka grūsnu un negrūsnu dzīvnieku jutība var atšķirties. Augstākais devas līmenis jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksisku ietekmi, bet ne nobeigšanos vai acīmredzamas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas tāda lejupēja devas līmeņu virkne, lai ar to varētu parādīt jebkādas ar devu saistītas atbildreakcijas, kā arī to, ka zemākajā devas līmenī nelabvēlīga ietekme nav novērojama. Optimums bieži vien ir divkārši līdz četrkārši intervāli, un bieži vien ir ieteicamāk pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti plašu devu intervālu (piemēram, vairāk nekā 10 reizes).

30. Ja ir novērota vispārēja toksicitāte (piemēram, ķermeņa masas samazināšanās, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildreakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz jutīgiem endokrīnajiem beigupunktiem.

Robežtests

31. Ja perorālajā pētījumā, kurā izmanto vienu devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg/kg ķermeņa masas dienā, vai – ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzirdināmajā ūdenī (aprēķināts pēc ķermeņa masas), un kuru veic, ievērojot šajā pētījumā aprakstītās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav sagaidāma, var

▼M8

uzskatīt, ka pilns pētījums ar vairākiem devu līmeņiem nav vajadzīgs. Robežtestu neizmanto gadījumos, kad cilvēka ekspozīcija norāda uz to, ka ir jāizmanto augstāks devas līmenis. Ja izmanto citus ievadīšanas veidus, tādus kā ieelpošana vai aplicēšana uz ādas, maksimālā sasniedzamā ekspozīcija bieži vien ir atkarīga no testējamo ķimikāliju fizikālķīmiskajām īpašībām.

Devu došana

32. Dzīvnieki testējamās ķimikālijas devu saņem katru dienu 7 dienas nedēļā. Ja izmanto gavāžu, dzīvniekiem testējamā ķimikālija jāsaņem vienreizējā devā, ko ievada ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testa dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa masas, izņemot tādus ūdens šķīdumus, kur var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Izņemot kairinošas vai kodīgas testējamās ķimikālijas, kam lielākās koncentrācijās parasti ir saasināta ietekme, testa tilpuma mainība būtu jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos saglabātos konstants tilpums.

33. Ja testējamās ķimikālijas ievada ar uzturu vai dzirdināmo ūdeni, ir svarīgi nodrošināt, ka testējamās ķimikālijas daudzums neizjauc normālu uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa masu; izmantotā alternatīva ir jānorāda. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar gavāžu, deva jādod katru dienu vienādā laikā un vismaz reizi nedēļā jākoriģē tā, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa masu. Ja kombinēto pētījumu izmanto par provizorisku pētījumu ilgtermiņa vai pilnīgam reproduktīvās toksicitātes pētījumam, abos pētījumos jāizmanto līdzīgs uzturs.

Eksperimenta grafiks

34. Devas abu dzimumu dzīvniekiem jāsāk dot 2 nedēļas pirms pārošanas, pēc tam, kad tie vismaz piecas dienas tikuši aklimatizēti un mātītēm ir novēroti normāli estrālie cikli (divu nedēļu ilgā priekšapstrādes periodā). Pētījums jāplāno tā, lai estrālā cikla izvērtēšana sāktos drīz pēc tam, kad dzīvnieki ir sasnieguši pilnīgu dzimumgatavību. Dažādām žurku līnijām pilnīgas dzimumgatavības sasniegšanas vecums dažādās laboratorijās var nedaudz atšķirties, piemēram, *Sprague Dawley* līnijas žurkas to sasniedz 10 nedēļu vecumā, *Wistar* līnijas žurkas — 12 nedēļu vecumā. Mātes ar pēcnācēju jānonāvē 13. pēcdzemdību dienā vai drīz pēc tam. Lai nodrošinātu, ka mātes nakti pirms asins ņemšanas (ja izvēlēts šis variants) nav barojušās, mātes un to pēcnācējs nav obligāti jānogalina tajā pašā dienā. Dzimšanas diena (proti, dienā, kurā dzemdības ir beigušās) ir 0. pēcdzemdību diena. Mātītes, kam nav novērojamas kopulācijas pazīmes, nonāvē 24–26 dienas pēc pēdējās pārošanas perioda dienas. Pārošanas perioda laikā abu dzimumu dzīvniekiem devas turpina dot. Pēc pārošanas perioda tēviņiem devas jāturpina dot vismaz līdz minimālā kopējā devu došanas perioda (28 dienas) beigām. Pēc tam tos vai nu nonāvē, vai arī patur dzīvus un tiem turpina dot devas, lai tos, iespējams, izmantotu otrai pārošanai, ja tāda vajadzīga.

35. Vecākpaaudzes mātītēm devas turpina dot katru dienu visu grūsnības laiku un vismaz līdz 13. pēcdzemdību dienai vai dienai pirms nonāvēšanas (minētās dienas ieskaitot). Pētījumos, kuros testējamo ķīmisko vielu ievada inhalācijas ceļā vai caur ādu, devas jāturpina dot vismaz līdz gestācijas 19. dienai (ieskaitot) un jāatsāk dot pēc iespējas drīz, bet ne vēlāk kā 4. dienā pēc dzemdībām.

▼M8

36. Satelītgrupas dzīvniekus (ja tie iekļauti), kas paredzēti papildu novērojumiem, nepāro. Pēc pirmās plānotās mātīšu nonāvēšanas tie jātur vēl vismaz 14 dienas bez apstrādes, lai detektētu toksiskās ietekmes vēlīnu parādīšanos vai noturību, vai atgūšanos no tās.

37. Eksperimenta grafika shēma ir dota 2. papildinājumā.

Estrālie cikli

38. Lai pētījumam atlasītu mātītes ar regulāru cikliskumu, pirms apstrādes sākšanas jānovēro estrālie cikli (sk. 27. punktu). No apstrādes perioda sākuma līdz brīdim, kad ir novērotas pārošanās pazīmes, katru dienu jāveic arī vaginālo uztriepju monitorings. Ja pastāv bažas par akūta stresa ietekmi, kas, uzsākot devu došanu, var mainīt estrālos ciklus, laboratorijas var testa dzīvniekus divas nedēļas pakļaut ekspozīcijai un pēc tam reizi dienā ievākt vaginālās uztriepes, lai pirmspārošanas periodā vismaz divas nedēļas veiktu estrālo ciklu monitoringu, ko turpina veikt arī pārošanas periodā, līdz ir iegūti pārošanās pierādījumi. Iegūstot maksts / dzemdes kakla šūnas, jārūpējas par to, lai nepieļautu gļotādas bojājumus, kas var inducēt viltus grūsnību (8) (9).

Pārošanas procedūra

39. Parasti šajā pētījumā jāizmanto pārošanas shēma 1:1 (viens tēviņš uz vienu mātīti). Izņēmumi pieļaujami tēviņu nāves gadījumā. Mātīte jātur kopā ar to pašu tēviņu, līdz tiek novērotas kopulācijas pazīmes vai ir pagājušas divas nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūsnību sāk skaitīt no dienas, kurā ir apstiprinājies kopulācijas fakts (konstatēts maksts embols vai sperma). Ja pārošana ir nesekmīga, var apsvērt mātīšu atkārtotu pārošanu ar tās pašas grupas tēviņiem.

Metiena lielums

40. Ceturtajā dienā pēc piedzimšanas katra metiena lielumu var koriģēt, nejaušināti izņemot liekos mazuļus tā, lai katrā metienā pēc iespējas būtu četri vai pieci katra dzimuma mazuļi atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma. No diviem liekajiem mazuļiem jāņem asins paraugi, tie jāapkopo un jāizmanto seruma T4 līmeņu noteikšanai. Mazuļu selektīva izņemšana, piemēram, pēc ķermeņa masas vai anoģenitālā attāluma (*AGD*), nav piemērota. Ja vīrišķā vai sievišķā dzimuma mazuļu skaita dēļ nav iespējams nodrošināt, ka katrā metienā ir četri vai pieci katra dzimuma mazuļi, ir pieļaujama metiena lieluma daļēja koriģēšana (piemēram, seši tēviņi un četras mātītes). Ja metiena lielums ir mazāks par korekcijas robežvērtību (8 vai 10 mazuļi vienā metienā), mazuļus no metiena neizņem. Ja korekcijas robežvērtību pārsniedz tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

41. Ja metiena lielums netiek koriģēts, 4. dienā pēc piedzimšanas divus mazuļus no katra metiena nonāvē un no tiem ņem asins paraugus, ko izmanto tiroīdhormona seruma koncentrācijas mērīšanai. Ja iespējams, diviem mazuļiem katrā metienā jābūt sievišķā dzimuma mazuļiem, lai vīrišķā dzimuma mazuļus rezervētu zīdekļu retencijas izvērtējumiem, izņemot gadījumus, kad šo mazuļu izņemšanas rezultātā galējam novērtējumam nepaliek neviena mātīte. Mazuļus no metiena neizņem, ja tā lielums būs mazāks nekā 8 vai 10 mazuļi vienā metienā (atkarībā no izmantotās žurku līnijas parastā metiena lieluma). Ja, pamatojoties uz parasto metiena lielumu, lieks ir tikai viens mazulis, izņem tikai vienu mazuli un no tā ņem asins paraugus, ko izmanto iespējamiem seruma T4 novērtējumiem.

▼M8

Novērojumi

42. Vismaz reizi dienā, vēlams — vienā un tajā pašā laikā vai laikos un ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimumperiodu pēc devu došanas, jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi. Jāreģistrē dzīvnieku veselības stāvoklis. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz morbiditāti un mirstību.

43. Vienu reizi pirms pirmās ekspozīcijas (lai varētu izdarīt salīdzinājumus vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vismaz reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojumi visiem vecākpaaudzes dzīvniekiem. Šie novērojumi jāizdara standartnožogojumā ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, katru dienu vienā un tajā pašā laikā. Tie rūpīgi jāreģistrē, ieteicams, izmantojot punktu sistēmas, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Jācenšas nodrošināt, lai testēšanas apstākļu mainība būtu minimāla un lai novērojumus izdarītu novērotāji, kas nav informēti par apstrādi. Jāreģistrē šādas pazīmes (neizsmeļošs saraksts): izmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādās, sekrētu un ekskrētu parādīšanās un veģetatīvās nervu sistēmas reakcijas (piemēram, asarošana, piloerekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas, neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska uzvedība (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana), grūtas vai ilgstošas dzemdības vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atmuguriski) (10).

44. Kādā brīdī pētījuma laikā jānovērtē piecu tēviņu un piecu mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, sensorā reaktivitāte uz dažāda veida kairinājumiem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioreceptīvajiem kairinājumiem) (8) (9) (11), satvēriena spēks (12) un kustību aktivitāte (13). Papildinformācija par izmantojamajām procedūrām ir atrodama attiecīgajos atsauces materiālos. Tomēr norādīto procedūru vietā var izmantot arī citas procedūras. Tēviņiem šie funkcionālie novērojumi jāveic, tuvojoties devu došanas perioda beigām, neilgi pirms plānotās nonāvēšanas, bet pirms asins paraugu ņemšanas hematoloģijai vai klīniskās ķīmijas izmeklējumiem (sk. 53.–56. punktu, arī 1. zemsvītras piezīmi). Mātītēm šo funkcionālo testu laikā jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī, un tās vēlams testēt vienu reizi pēdējās laktācijas nedēļas laikā (piemēram, 6.–13. laktācijas dienā), neilgi pirms plānotās nonāvēšanas. Māšu un mazuļu atšķiršanas laikiem jābūt pēc iespējas īsākiem.

45. Funkcionālos novērojumus, kas veicami vienu reizi pētījuma beigās, var neveikt, ja pētījums ir provizorisks pētījums turpmākam subhroniskam (90 dienas) vai ilgtermiņa pētījumam. Tādā gadījumā funkcionālie novērojumi ir jāiekļauj minētajā turpmākajā pētījumā. Tomēr šajā atkārtotas devas pētījumā iegūtie funkcionālo novērojumu dati var atvieglot devu līmeņu izvēli turpmākajam subhroniskajam vai ilgtermiņa pētījumam.

46. Izņēmuma kārtā funkcionālos novērojumus var neveikt arī tām grupām, kurām toksicitātes pazīmes izpaužas tādā mērā, kas varētu ievērojami traucēt funkcionālā testa veikšanu.

47. Jāreģistrē gestācijas ilgums, ko aprēķina no 0. grūsnības dienas. Pēc atnešanās katru metienu iespējami drīz pārbauda, lai noteiktu mazuļu, nedzīvi dzimušo, dzīvi dzimušo un nīkuļu (mazuļi, kas ir ievērojami mazāki nekā atbilstīgie kontrolmazuļi) skaitu un dzimumu un acīmredzamu anomāliju klātbūtni.

▼M8

48. 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. diena pēc piedzimšanas) un vismaz 4. un 13. dienā pēc piedzimšanas jāsaskaita dzīvie mazuļi un jānosaka to dzimums, un jānosver metieni. Papildus vecākpaaudzes dzīvnieku novērojumiem (sk. 43. un 44. punktu) jāreģistrē pēcnācēju uzvedības anomālijas.

49. Katra mazuļa *AGD* jāmēra vienā un tajā pašā dienā pēc piedzimšanas no 0. līdz 4. dienai pēc piedzimšanas. Mazulis ir jānosver tajā pašā dienā, kad tiek mērīts *AGD*, un *AGD* ir jāpielāgo mazuļa izmēram, priekšroku dodot kvadrātsaknei no ķermeņa svara (14). Kā ieteikts ESAO *GD* 151 (15), 12. vai 13. dienā pēc piedzimšanas ir jāsaskaita vīrišķā dzimuma mazuļu zīdekļi/areolas.

Ķermeņa masa un barības/ūdens patēriņš

50. Tēviņi un mātītes jānosver pirmajā devas došanas dienā, tad vismaz reizi nedēļā un pētījuma beigās. Grūsnības laikā mātītes jānosver 0., 7., 14. un 20. dienā un 24 stundu laikā pēc atnešanās (0. vai 1. pēcdzemdību diena), kā arī vismaz 4. un 13. pēcdzemdību dienā. Novērojumu rezultāti jāreģistrē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

51. Pirmspārošanas, grūsnības un laktācijas laikā barības patēriņš jāmēra vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērīšana pārošanas laikā ir fakultatīva. Ja testējamo ķimikāliju ievada ar ūdeni, minētajos laikposmos ir jāmēra arī ūdens patēriņš.

Hematoloģija

52. Pētījuma laikā pieciem tēviņiem un piecām mātītēm, kas nejauši izvēlētas no katras grupas, vienu reizi jāveic šādi hematoloģiski izmeklējumi: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaits, retikulocīti, leikocītu skaits un leikocitārā formula, trombocītu skaits un asinsreces laika/potenciāla noteikšana. Ja testējamajai ķimikālijai vai tās iespējamajiem metabolītiem ir oksidējošas īpašības vai pastāv aizdomas, ka tiem tādas varētu būt, jānosaka arī methemoglobīna koncentrācija un Heinca ķermenīši.

53. Asins paraugi jāņem no norādītās vietas. Paraugu ņemšanas laikā mātītēm ir jābūt fizioloģiski līdzīgā stāvoklī. Lai izvairītos no praktiskām grūtībām, kas saistītas ar mainību grūsnības sākumā, asins savākšanu mātītēm var veikt pirms pārošanas perioda beigām kā alternatīvu paraugu ņemšanai tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Asins paraugus no tēviņiem vēlams ņemt tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās ietvaros. Alternatīvi asins savākšanu tēviņiem var veikt arī pārošanas perioda beigās, ja šis brīdis ticis izvēlēts mātītēm.

54. Asins paraugi jāglabā piemērotos apstākļos.

Klīniskā bioķīmija

55. Asins paraugiem, kas iegūti no izvēlētiem pieciem tēviņiem un piecām mātītēm katrā grupā, veic klīniskās bioķīmijas analīzes, lai izpētītu būtisku toksisko ietekmi uz audiem un, konkrēti, uz nierēm un aknām. Ir ieteicams

▼M8

dzīvniekus nakti pirms asins paraugu ņemšanas nebarot ([1]). Plazmā vai serumā jānosaka nātrijs, kālijs, glikoze, kopējais holesterīns, urīnviela, kreatinīns, kopējais olbaltums un albumīns, vismaz divi fermenti, kas norāda uz hepatocelulāro ietekmi, (piemēram, alanīnaminotransferāze, aspartātaminotransferāze un sorbitoldehidrogenāze) un žultsskābes. Noteiktos apstākļos noderīgu informāciju var sniegt papildu fermentu (aknu fermentu vai citu fermentu) un bilirubīna noteikšana.

56. Asins paraugus no noteiktas vietas ņem saskaņā ar šādu grafiku:

— 4. dienā pēc piedzimšanas — no vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, ja mazuļu skaits to ļauj (sk. 40.-41. punktu),

— pētījuma beigās 13. dienā — no visām mātēm un vismaz diviem mazuļiem katrā metienā, un

— pētījuma beigās — no visiem pieaugušiem tēviņiem.

Visus asins paraugus glabā piemērotos apstākļos. Asins paraugos, kas ņemti no mazuļiem 13. dienā un pieaugušiem tēviņiem, nosaka tiroīdhormonu (T4) seruma līmeņus. Ja vajadzīgs, T4 līmeņus nosaka arī asins paraugos, kas ņemti no mātēm un 4. dienas mazuļiem. Attiecīgā gadījumā var fakultatīvi mērīt citus hormonus. Tiroīdhormona analīžu veikšanai mazuļu asinis var apkopot pa metieniem. Tiroīdhormonus (T4 un TSH) vēlams mērīt kopējā formā (kopējais T4 un kopējais TSH).

57. Pēdējā pētījuma nedēļā, izmantojot urīna savākšanu noteiktā laika periodā, pieciem nejauši izvēlētiem tēviņiem katrā grupā pēc izvēles var veikt šādus urīnanalīzes mērījumus: izskats, tilpums, osmolalitāte vai īpatnējais svars, pH, proteīns, glikoze un asinis/ asins šūnas.

58. Turklāt jāapsver iespēja veikt vispārēja audu bojājuma seruma marķieru izpēti. Ja testējamās ķimikālijas zināmās īpašības var ietekmēt saistītos metaboliskos profilus vai ir aizdomas par šādu ietekmi, jānosaka arī kalcijs, fosfāts, triglicerīdu līmenis tukšā dūšā un glikoze tukšā dūšā, īpaši hormoni, methemoglobīns un holīnesterāze. Tie jānosaka katrā gadījumā atsevišķi.

59. Noteikto hormonu mainību un absolūto koncentrāciju var ietekmēt šādi faktori:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

([1]) Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekus nakti pirms asins ņemšanas nebarot. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami palielinātu rezultātu mainību, kas varētu maskēt neizteiktāku ietekmi un apgrūtināt interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var ietekmēt (grūsno) dzīvnieku vispārējo vielmaiņu, traucēt laktāciju un zīdīšanu un jo īpaši barošanas pētījumos var ierobežot ikdienas eksponētību testējamajai ķimikālijai. Ja tiek izlemts dzīvniekus uz nakti atstāt bez barības, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas tēviņiem 4. nedēļā. Mātes jāpatur vēl vienu dienu pēc mazuļu izņemšanas, ko veic, piemēram, 13. dienā pēc piedzimšanas. Mātes jāatstāj uz nakti bez barības no 13. vai 14. laktācijas dienas, un pētījuma beigās ņemtie asins paraugi jāizmanto klīniskās ķīmijas parametru noteikšanai.

▼M8

— nonāvēšanas metode, kurā dzīvniekiem netiek radīts nevajadzīgs stress, kas varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas testa komplekti, kas var atšķirties pēc standartlīknēm.

60. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem.

61. Ja vēsturiskie bāzlīnijas dati ir nepietiekami, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas mainīgos lielumus pirms devu došanas sākšanas vai, vēlams, dzīvniekiem, kas nav ietverti eksperimentālajās grupās. Dati par mātītēm jāiegūst no dzīvniekiem laktācijas periodā.

PATOLOĢIJA

Makroskopiskā autopsija

62. Visiem pētījumā izmantotajiem pieaugušajiem dzīvniekiem jāveic pilna, detalizēta makroskopiska autopsija, kas ietver ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa, krūšu un vēdera dobumu un to satura rūpīgu izpēti. Īpaša uzmanība jāpievērš reproduktīvās sistēmas orgāniem. Jāreģistrē implantācijas vietu skaits. Autopsijas dienā jāizmeklē vaginālās uztriepes, lai noteiktu estrālā cikla fāzi un ļautu to saistīt ar mātīšu reproduktīvo orgānu histopatoloģiju.

63. Visu pieaugušo tēviņu sēklinieki un sēklinieku piedēkļi, kā arī prostata un sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām (kopā) pēc vajadzības jāatbrīvo no pieguļošiem audiem, un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Turklāt fakultatīvos orgānu masas mērījumos var ietvert arī tūpļa cēlājmuskuļa un briedumķermeņa muskuļa kompleksu, Kupera dziedzerus un dzimumlocekļa galviņu tēviņiem un abas olnīcas (slapjais svars) un dzemdi (ar dzemdes kaklu) mātītēm; ietveršanas gadījumā minētie masas mērījumi jāveic iespējami drīz pēc disekcijas. Jāsaglabā visu pieaugušo dzīvnieku olnīcas, sēklinieki, sēklinieku piedēkļi, iekšējie dzimumorgāni un visi orgāni, kam ir makroskopiski bojājumi.

64. Vairogdziedzeri, kas ņemti no visiem pieaugušajiem tēviņiem un mātītēm un viena 13 dienas veca vīrišķā dzimuma un sievišķā dzimuma mazuļa katrā metienā, vispiemērotākajā fiksējošajā vidē jāsaglabā paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai. Vairogdziedzera masu var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no pieguļošiem audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai izvairītos no audu bojājumiem. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi. Asins paraugi jāņem no precīzi norādītas vietas tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās laikā un jāglabā piemērotos apstākļos (sk. 56. punktu).

▼**M8**

65. Turklāt vismaz piecu pieaugušu tēviņu un mātīšu, kas nejauši izvēlētas no katras grupas (izņemot dzīvniekus, kas ir nāvei tuvā stāvoklī un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām), aknas, nieres, virsnieres, tīms, liesa, smadzenes un sirds pēc vajadzības jāatbrīvo no piegulošiem audiem un to slapjais svars jānosaka iespējami drīz pēc disekcijas, lai izvairītos no izžūšanas. Šādi audi jāglabā audu tipam un paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai vispiemērotākajā fiksējošajā vidē: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvas daļas, tostarp galasmadzenes, smadzenītes un tilts), muguras smadzenes, acis, kuņģis, tievā un resnā zarna (arī Peijera plātnīte), aknas, nieres, virsnieres, liesa, sirds, tīms, traheja un plaušas (saglabātas, piepūšot ar fiksatoru un pēc tam iegremdējot), gonādas (sēklinieki un olnīcas), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar prostatas priekšējo daivu), vagīna, urīnpūslis, limfmezgli (saskaņā ar laboratorijas pieredzi papildus proksimālam drenējošam limfmezglam ir jāņem vēl viens limfmezgls (16)), perifērais nervs (sēžas nervs vai apakšstilba nervs), vēlams, tiešā muskuļa tuvumā, skeleta muskulis un kauls ar kaula smadzenēm (izgriezums vai, alternatīvi, svaigs kaula smadzeņu aspirāts). Sēkliniekus ieteicams fiksēt, iegremdējot tos Buēna fiksatorā vai Davidsona fiksatorā (16) (17) (18); šos audus nav ieteicams fiksēt formalīnā. Lai nodrošinātu fiksatora ātru penetrēšanos, bālgano apvalku (*tunica albuginea*) var abos orgāna polos uzmanīgi un sekli pārdurt ar adatu. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmajām testējamās ķimikālijas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem.

66. Vērtīgas norādes par endokrīnu iedarbību var gūt no šādiem audiem: gonādas (olnīcas un sēklinieki), iekšējie dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, sēklas pūslīši ar prostatas priekšējām daivām, dorsolaterālā un ventrālā prostata), vagīna, hipofīze, tēviņu krūts dziedzeris un virsnieru dziedzeris. Tēviņu krūts dziedzeru pārmaiņas nav pietiekami dokumentētas, taču šis parametrs var būt ļoti jutīgs pret vielām ar estrogēnisku iedarbību. To orgānu/audu novērošana, kas nav uzskaitīti 65. punktā, nav obligāta.

67. Nedzīvi mazuļi un mazuļi, kas nonāvēti 13. dienā pēc piedzimšanas vai drīz pēc tam, vismaz rūpīgi ārēji jāpārbauda, lai konstatētu iespējamas acīmredzamas anomālijas. Īpaša uzmanība jāpievērš ārējām reproduktīvajām ģenitālijām, kuras jāpārbauda, meklējot attīstības izmaiņu pazīmes.

Histopatoloģija

68. Saglabātajiem orgāniem un audiem, kas iegūti no atlasītajiem kontrolgrupas un lielākās devas grupas dzīvniekiem, veic pilnu histopatoloģisko izmeklēšanu (īpašu uzsvaru liekot uz spermatoģenēzes posmiem tēviņu gonādās un sēklinieku intersticiālo šūnu struktūras histopatoloģiju). Vajadzības gadījumā var izmeklēt mazuļu un pārējo pieaugušo dzīvnieku vairogdziedzeri. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar apstrādi saistītas pārmaiņas, minētie izmeklējumi jāattiecina arī uz citu devu grupu dzīvniekiem. Norādījumos par histopatoloģiju (10) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu disekciju, fiksāciju, secēšanu un histopatoloģiju.

69. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi. Lai palīdzētu noskaidrot *NOAEL*, jāizmeklē mērķorgāni citās devu grupās, jo īpaši grupās, kas uzrāda *NOAEL*.

▼M8

70. Ja izmanto satelītgrupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, uz kuriem apstrādātajās grupās ir konstatēta ietekme.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

71. Jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, kurā redzams testa sākumā katrā testā grupā esošo dzīvnieku skaits, to dzīvnieku skaits, kas atrasti miruši testa laikā vai eitanazēti humānu apsvērumu dēļ, nāves iestāšanās vai eitanāzijas laiks, auglīgo dzīvnieku skaits, grūsno mātīšu skaits, to dzīvnieku skaits, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju apraksts, arī toksiskās darbības sākuma laiks, ilgums un stiprums, histopatoloģisko pārmaiņu veidi un visi relevantie dati par metienu. Tabulas veidā sagatavotā kopsavilkuma ziņojuma paraugs, kas ir ļoti noderīgs ietekmes uz reprodukciju/attīstību izvērtēšanai, ir sniegts 3. papildinājumā.

72. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Salīdzinot ietekmi visā devu diapazonā, jāizvairās no vairāku t-testu izmantošanas. Statistikas metodes jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā. *AGD* un zīdekļu retencijas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā ietekmi uz metienu. Vajadzības gadījumā analīzes vienība ir metiens. Mazuļu ķermeņa masas statistiskajai analīzei jābalstās uz atsevišķu mazuļu datiem, ņemot vērā metiena lielumu. Tā kā pētījuma tvērums ir ierobežots, statistiskajai analīzei, ko veic, lai izvērtētu rezultātu nozīmīgumu, ir ierobežota vērtība attiecībā uz daudziem beigupunktiem, jo īpaši reproduktīvajiem beigupunktiem. Dažas no visplašāk izmantotajām metodēm, jo īpaši parametriskie testi centrālās tendences mērīšanai, nav piemērotas. Ja tiek izmantota statistiskā analīze, izvēlētajai metodei jābūt atbilstošai pārbaudāmā mainīgā lieluma sadalījumam, un tā jāizvēlas pirms pētījuma sākšanas.

Rezultātu izvērtēšana

73. Šā toksicitātes pētījuma konstatējumi jāizvērtē, ņemot vērā novēroto ietekmi, autopsiju un mikroskopiskos konstatējumus. Vērtējums ietver testējamās ķimikālijas devas saistību ar anomāliju — to vidū makroskopisko bojājumu, identificēto mērķorgānu, neauglības, klīnisko anomāliju, ietekmes uz reproduktīvajiem un metiena rādītājiem, ķermeņa masas pārmaiņu, ietekmes uz mirstību un citas toksiskās iedarbības – esību vai neesību, incidenci un smagumu.

74. Tēviņu apstrādes periods ir īss, tāpēc, novērtējot ietekmi uz tēviņu reproduktīvo funkciju, papildus auglības datiem jāņem vērā sēklinieku un sēklinieku piedēkļu histopatoloģija. Pētījuma interpretēšanā par palīglīdzekli var būt lietderīgi izmantot arī vēsturiskus kontroles datus par reprodukciju/ontoģenēzi (piemēram, datus par metiena lielumu, *AGD*, zīdekļu retenciju, seruma T4 līmeņiem), ja tādi pieejami.

75. Kvalitātes kontroles vajadzībām ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontroldatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

▼M8

Testēšanas pārskats

76. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja tā zināma;

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.;

daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Nesējs (attiecīgā gadījumā):

— nesēja izvēles pamatojums, ja nesējs nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

— izmantotās sugas/līnijas,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— avots, turēšanas apstākļi, uzturs u. tml.,

— katra dzīvnieka masa testa sākumā,

— sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas nosacījumi:

— devu līmeņa izraudzīšanās pamatojums,

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas maisījuma/barības preparāta sagatavošanu, sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

▼**M8**

— detalizēta informācija par testējamās ķimikālijas devu došanu,

— attiecīgā gadījumā testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ppm) barībā / dzirdināmajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa masas dienā),

— detalizēta informācija par barības un ūdens kvalitāti,

— detalizēts apraksts par nejaušināšanas procedūru, kas izmantota, lai atlasītu mazuļus izņemšanai no metiena, ja šāda izņemšana notikusi.

Rezultāti:

— ķermeņa masa / ķermeņa masas izmaiņas,

— attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,

— dati par toksiskajām atbildes reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī dati par auglību, gestāciju un citām toksicitātes pazīmēm,

— gestācijas ilgums,

— toksiska vai cita iedarbība uz reprodukciju, pēcnācējiem, postnatālo augšanu utt.,

— klīnisko novērojumu veids, smagums un ilgums (atgriezenisks vai neatgriezenisks),

— sensoriskās aktivitātes, satvēriena spēka un kustību aktivitātes novērtējums,

— hematoloģiskie testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,

— klīniskās bioķīmijas testi ar attiecīgajām bāzes līnijas vērtībām,

— pieaugušu mātīšu skaits ar normālu vai nenormālu estrālo ciklu un cikla ilgums,

— dzīvi dzimušo skaits un pēcimplantācijas zudums,

— to mazuļu skaits, kam ir makroskopiskas anomālijas, ārējo ģenitāliju makroskopisks izvērtējums, nīkuļu skaits,

— nāves iestāšanās laiks testa laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz pētījuma beigām,

— implantāciju skaits, metiena lielums un masa datu reģistrēšanas laikā,

— mazuļu ķermeņa masas dati,

— visu mazuļu *AGD* (un ķermeņa masa *AGD* mērīšanas dienā),

— zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem,

— vairogdziedzera hormonu līmenis 13 dienu veciem mazuļiem un pieaugušiem tēviņiem (un mātēm un 4 dienas veciem mazuļiem, ja šādi mērījumi veikti),

— ķermeņa masa nonāvēšanas laikā un dati par vecākpaaudzes dzīvnieku orgānu masu,

— autopsijas konstatējumi,

— histopatoloģiskas izmeklēšanas rezultātu detalizēts apraksts,

— absorbcijas dati (ja pieejami),

— rezultātu statistiskā apstrāde (attiecīgā gadījumā).

Rezultātu iztirzājums.

Secinājumi.

▼M8

Rezultātu interpretēšana

77. Pētījums sniegs izvērtējumu par reproduktīvo/ontoģenētisko toksicitāti, kas saistīta atkārtotu devu došanu. Konkrētāk, tā kā uzsvars ir likts uz vispārējās toksicitātes un reproduktīvās/ontoģenētiskās toksicitātes beigupunktiem, pētījuma rezultāti ļaus reproduktīvo/ontoģenētisko ietekmi, kas radusies bez vispārējas toksicitātes, atšķirt no ietekmes, kura izpaužas tikai pie līmeņiem, kas ir toksiski arī vecākpaaudzes dzīvniekiem (sk. 7.–11. punktu). Tas varētu norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākas izmeklēšanas un sniegt norādījumus turpmāko pētījumu plānošanā. Ar reprodukciju un ontoģenēzi saistīto rezultātu interpretēšanā par palīglīdzekli jāizmanto ESAO norādījumu dokuments Nr. 43 (19). ESAO norādījumu dokumentā Nr. 106 par grauzēju endokrīno un reproduktīvo testu histoloģisko izvērtēšanu (16) sniegta informācija par (endokrīno) orgānu un vaginālo uztriepju sagatavošanu un izvērtēšanu; minētā informācija var būt noderīga saistībā ar šo testēšanas metodi.

LITERATŪRA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(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. and 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. and 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). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) 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. and 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. and 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., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) 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.

(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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and 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.

(18) 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.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS (SK. ARĪ (20) ESAO *GD 150*)

Androgenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17ß) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska tiroīdhormona (piemēram, T_3) darbību.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Ontoģenētiskā toksicitāte reproduktīvās toksicitātes izpausme, kas liecina par pēcnācēju prenatāliem, perinatāliem, postnatāliem, strukturāliem vai funkcionāliem traucējumiem.

Deva ir ievadītās testējamās ķimikālijas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķimikālijas masu uz testa dzīvnieka ķermeņa masas vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa masas dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās ievadīšanas biežumu un ilgumu.

Izteikta toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķimikālijas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt bīstamību, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksicitātes pazīmes un, iespējams, mirstību.

Fertilitātes traucējumi ir tēviņu vai mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Maternālā toksicitāte nelabvēlīgā ietekme uz gravidām mātītēm, kas ir specifiska (tieša ietekme) vai nespecifiska (netieša ietekme) un saistīta ar gravidu stāvokli.

NOAEL ir saīsinājums, kas apzīmē nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17ß).

Reproduktīvā toksicitāte ir kaitīga ietekme uz pēcnācējiem un/vai tēviņu un mātīšu reproduktīvās funkcijas vai spējas traucējumi.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

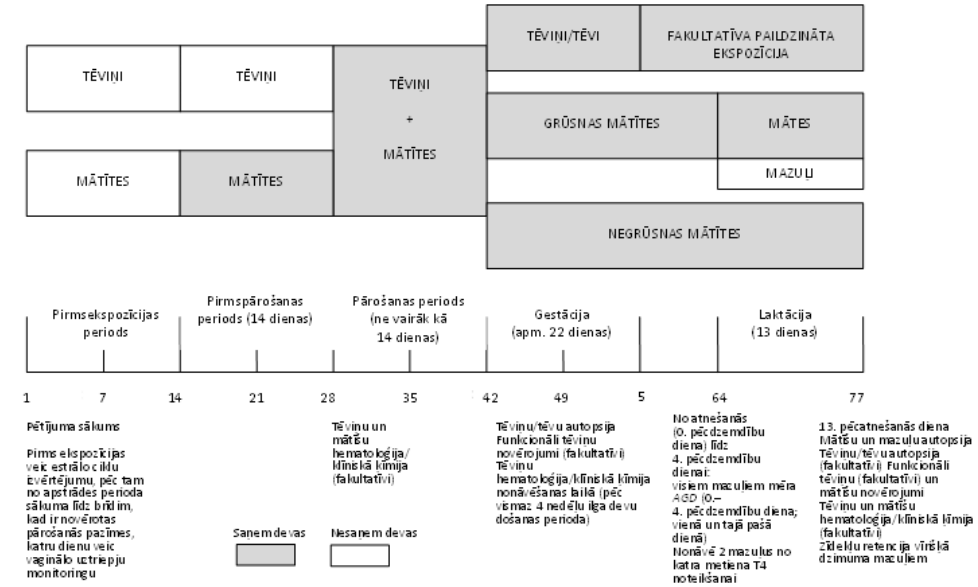
Tireoidāla iedarbība ir ķimikālijas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam tiroīdhormonam (piemēram, T_3).

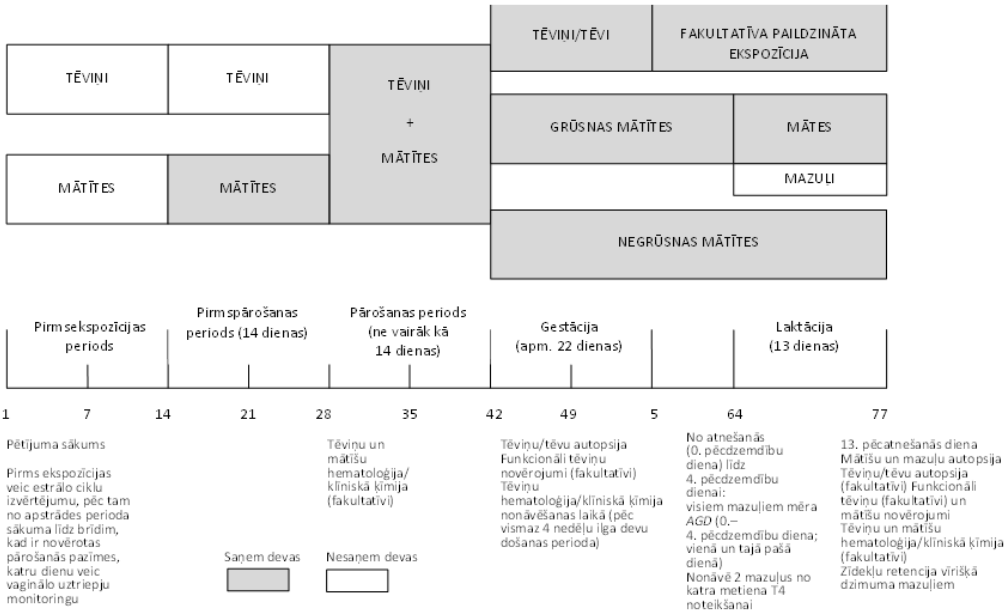
Validācija ir zinātnisks process, kura mērķis ir raksturot testēšanas metodes darbības prasības un ierobežojumus un apliecināt tās ticamību un piemērotību konkrētam nolūkam.

▼**M8**

2. papildinājums

EKSPERIMENTA GRAFIKA SHĒMA, KURĀ NORĀDĪTS MAKSIMĀLAIS PĒTĪJUMA ILGUMS, KURA PAMATĀ IR 14 DIENU ILGS PĀROŠANAS PERIODS





▼**M8**

3. papildinājums

TABULAS VEIDĀ SAGATAVOTS KOPSAVILKUMA ZIŅOJUMS PAR IETEKMI UZ REPRODUKCIJU/ONTOĢENĒZI

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Dozējums (vienības)	0 (kontrole)	…	…	…	…
Dzīvnieku pāri (N)					
Estrālais cikls (vismaz vidējais neregulāru ciklu ilgums un biežums)					
Mātītes, kam novērojamas kopulācijas pazīmes (N)					
Grūsnas mātītes (N)					
Apaugļošanās dienas 1–5 (N)					
Apaugļošanās dienas 6–...([1] (1)) (N)					
Grūsnība≤21 diena (N)					
Grūsnība = 22 dienas (N)					
Grūsnība ≥ 23 dienas (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem (N)					
Mātes ar dzīviem mazuļiem 4. dienā pēc dzemdībām (N)					
Implanti vienai mātei (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei piedzimšanas brīdī (vidēji)					
Dzīvie mazuļi vienai mātei 4. dienā (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) piedzimstot (vidēji)					
Dzimumu attiecība (tēv./māt.) 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa piedzimstot (vidēji)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Mazuļu masa piedzimstot (vidēji)					
Mazuļu masa *AGD* mērīšanas laikā (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Mazuļu *AGD* tajā pašā postnatālajā dienā, laikā no dzimšanas līdz 4. dienai (tēviņu vidējā masa, mātīšu vidējā masa)					
Metiena masa 4. dienā (vidēji)					
Metiena masa 13. dienā (vidēji)					

▼M8

NOVĒROJUMI	VĒRTĪBAS				
Zīdekļu retencija vīrišķā dzimuma mazuļiem 13. dienā (vidēji)					
MAZUĻI AR ANOMĀLIJĀM					
Mātes, kam nav neviena šāda mazuļa					
Mātes ar 1 šādu mazuli					
Mātes ar ≥ 2 šādiem mazuļiem					
PĒCNĀCĒJU ZUDUMI					
Prenatāli (implantāciju skaits mīnus dzīvi dzimušo skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					
Postnatāli (dzīvi dzimušo skaits mīnus 13. postnatālajā dienā dzīvo mazuļu skaits)					
Mātītes, kas nav zaudējušas mazuli					
Mātītes ar vienu zaudētu mazuli					
Mātītes ar diviem zaudētiem mazuļiem					
Mātītes ar ≥ 3 zaudētiem mazuļiem					

([1]) pārošanas perioda pēdējā diena

▼M8

B.65. *IN VITRO* BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODE ATTIECĪBĀ UZ ĀDAS KOROZIJU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 435 (2015). Ādas korozija ir nepārejošs ādas bojājums, kas izpaužas kā tāda redzama nekroze visā epidermā, kura ietiecas dermā un radusies pēc tam, kad uz ādas aplicēta testējamā ķimikālija atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (*GHS*) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Šī testēšanas metode, kas ir ekvivalenta atjauninātajai ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 435, nosaka *in vitro* barjermembrānas testa metodi, ko var izmantot kodīgu ķimikāliju identificēšanai. Testēšanas metodē izmanto mākslīgu membrānu, kas izstrādāta tā, lai tā reaģētu uz kodīgām ķimikālijām līdzīgā veidā kā dzīvnieku āda *in situ*.

2. Kodīgumu ādai parasti novērtē, aplicējot testējamo ķimikāliju uz dzīvu dzīvnieku ādas un nosakot audu bojājumu pakāpi pēc noteikta laika (2). Papildus šai testēšanas metodei ir pieņemtas vairākas citas *in vitro* testēšanas metodes, kas ir alternatīvas (3)(4) *in vivo* standartprocedūrai ar truša ādu (šā pielikuma B.4. nodaļa, ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 404), kuru izmanto kodīgu ķimikāliju identificēšanai (2). ANO *GHS* secīgu pārbaužu un izvērtēšanas stratēģijā kodīguma ādai novērtēšanai un klasificēšanai un ESAO norādījumu dokumentā par integrētu testēšanas un novērtēšanas pieeju (*IATA*) attiecībā uz ādas kairinājumu/koroziju ieteikts izmantot validētas un pieņemtas *in vitro* testēšanas metodes, kas aprakstītas 3. un 4. modulī (1)(5). *IATA* apraksta vairākus moduļus, kuros tiek grupēti informācijas avoti un analīzes rīki, un, pirmkārt, sniedz norādījumus par to, kā, novērtējot ķimikāliju potenciālu radīt ādas kairinājumu un ādas koroziju, integrēt un izmantot jau esošos testēšanā un citādi iegūtos datus, un, otrkārt, ierosina pieeju, ko izmantot, ja vajadzīga turpmāka testēšana, tostarp gadījumos, kad ir iegūti negatīvi rezultāti (5). Atbilstoši šai modulārajai pieejai pozitīvos rezultātus, kas iegūti, īstenojot *in vitro* testēšanas metodi, var izmantot ķimikāliju klasificēšanai par kodīgām vielām bez nepieciešamības veikt testus ar dzīvniekiem, tādējādi samazinot un pilnveidojot dzīvnieku izmantošanu un novēršot sāpes un diskomfortu, ko dzīvniekiem var radīt to izmantošana minētajam mērķim.

3. *In vitro* barjermembrānas modeļa, kas komerciāli pieejams ar nosaukumu *Corrositex*®, validācijas pētījumi ir pabeigti (6)(7)(8), un tie liecina, ka šā modeļa vispārējā pareizība ādas korozijas paredzēšanā ir 79 % (128/163), jutība — 85 % (76/89) un specifiskums — 70 % (52/74), izmantojot 163 vielu un maisījumu datubāzi (7). Šo validēto referencmetodi (VRM), pamatojoties uz tās atzīto derīgumu, ieteicams izmantot par daļu no secīgu pārbaužu stratēģijas ķimikāliju ādas korozijas briesmu potenciāla novērtēšanai (5)(7). Pirms attiecībā uz ādas koroziju iespējams regulatīvām vajadzībām izmantot kādu *in vitro* barjermembrānas modeli, saskaņā ar iepriekš noteiktiem veiktspējas standartiem (VS) (10) būtu jānosaka tā ticamība, relevantums (pareizība) un piedāvātā lietojuma ierobežojumi, lai būtu drošība par

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

tā līdzību VRM (9). ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual acceptance of data*) būs garantēta tikai tad, kad jebkāda jauna ierosināta vai atjaunināta VS atbilstoša metode būs izskatīta un iekļauta ekvivalentajā ESAO testēšanas vadlīnijā. Patlaban tikai viena *in vitro* metode ir iekļauta ESAO testēšanas vadlīnijā Nr. 435 un šajā testēšanas metodē, proti, komerciāli pieejamais *Corrositex*® modelis.

4. Citās testēšanas metodēs kodīguma ādai testēšanai izmanto rekonstruētu cilvēka ādu (ESAO *TG* Nr. 431) (3) un izolētu žurkas ādu (ESAO *TG* Nr. 430) (4). Šī testēšanas vadlīnija paredz arī kodīgo ķimikāliju iedalīšanu trīs ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās un trīs ANO transportēšanas iepakojuma grupās attiecībā uz kodīguma risku. Šī testēšanas vadlīnija sākotnēji pieņemta 2006. gadā un 2015. gadā atjaunināta, lai ietvertu atsauci uz *IATA* norādījumu dokumentu un atjauninātu standartvielu sarakstu.

DEFINĪCIJAS

5. Izmantotās definīcijas sniegtas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

6. Šajā testēšanas metodē aprakstītais tests dod iespēju identificēt kodīgas testējamās ķimikālijas un ļauj kodīgas testējamās ķimikālijas iedalīt apakškategorijās saskaņā ar ANO *GHS* / *CLP* (1. tabula). Turklāt šādu testēšanas metodi var izmantot, lai konkrētām transportēšanas testu vajadzībām pieņemtu lēmumus par konkrētu ķimikāliju klašu, piemēram, organisku un neorganisku skābju, skābju atvasinājumu ([1]) un bāžu, kodīgumu vai nekodīgumu (7)(11)(12). Šajā testēšanas metodē aprakstīta vispārēja procedūra, kas ir līdzīga validētajai testēšanas referencmetodei (7). Šī testēšanas metode gan pietiekami neinformē par ādas kairinājumu, taču jānorāda, ka tādai ietekmei uz veselību kā ādas kairinājums *in vitro* īpaši pievēršas TM B.46., kas ir ekvivalenta ESAO *TG* Nr. 439 (13). Attiecībā uz to, kā pilnīgi izvērtēt lokālo ietekmi uz ādu pēc vienreizējas dermālas ekspozīcijas, jāizmanto ESAO norādījumu dokuments par integrētajām testēšanas un novērtēšanas pieejām (5).

1. tabula

ANO *GHS* kategorija "Kodīgs ādai" un tās apakškategorijas ([1])

Kodīguma kategorija (1. kategorija) (iestādēm, kas neizmanto apakškategorijas)	Iespējamās kodīguma apakškategorijas ([1]) (iestādēm, kas izmanto apakškategorijas, tostarp *CLP* regulu)	Kodīgs ≥ 1 no 3 dzīvniekiem	
		Ekspozīcija	Novērošana
Kodīgs	Kodīguma apakškategorija 1A	≤ 3 minūtes	≤ 1 stunda
	Kodīguma apakškategorija 1B	> 3 minūtes / ≤ 1 stunda	≤ 14 dienas
	Kodīguma apakškategorija 1C	> 1 stunda / ≤ 4 stundas	≤ 14 dienas

([1]) Eiropas Savienībā *CLP* regula nosaka trīs kodīguma ādai apakškategorijas 1A, 1B un 1C.

7. Validētās referencmetodes (7) ierobežojums ir tāds, ka daudzas nekodīgas ķimikālijas un dažas kodīgas ķimikālijas, pamatojoties uz sākotnējā saderības testa rezultātiem (sk. 13. punktu), var netikt atzītas par derīgām testēšanai. Ķimikālijas uz ūdens bāzes, kuru pH ir diapazonā no 4,5 līdz 8,5, bieži vien nav derīgas testēšanai; tomēr 85 % no testētajām ķimikālijām, kuru pH ir minētajā diapazonā, nebija kodīgas testos ar dzīvniekiem (7). *In vitro* barjermembrānas metodi var izmantot, lai testētu cietvielas (ūdenī šķīstošas vai

([1]) "Skābes atvasinājums" ir nespecifiskas klases apzīmējums, un to plaši definē kā ķimikāliju, kas iegūta no kādas skābes vai nu tieši, vai ar modificēšanu vai daļēju aizstāšanu. Šajā klasē ietilpst anhidrīdi, halogēnskābes, sāļi un citi ķimikāliju veidi.

▼M8

neškīstošas), šķidrumus (ūdens vai neūdens) un emulsijas. Tomēr ar barjermembrānas metodi nevar testēt tādas testējamās ķimikālijas, kas neizraisa detektējamas izmaiņas saderības testā (piemēram, krāsas maiņu validētās testēšanas referencmetodes ķimikāliju detektēšanas sistēmā (*CDS*)); tās jātestē, izmantojot citas testēšanas metodes.

TESTA PRINCIPS

8. Testēšanas sistēmai ir divi komponenti: sintētiska makromolekulāra biobarjera un ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*); ar šo testēšanas metodi, izmantojot *CDS*, nosaka barjermembrānas bojājumus, kas rodas pēc kodīgas testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz sintētiskas makromolekulāras barjermembrānas (7) un ko izraisa, domājams, tie paši korozijas mehānismi, kuri iedarbojas uz dzīvu ādu.

9. Barjermembrānas penetrāciju (jeb ķimikālijas izlaušanos cauri tai) var mērīt, izmantojot vairākas procedūras vai *CDS*; to var mērīt arī pēc pH indikatorkrāsvielas krāsas izmaiņām vai kādu citu zem barjeras esoša indikatoršķīduma īpašību izmaiņām.

10. Jānosaka, vai barjermembrāna ir derīga, t. i., atbilstīga un uzticama, paredzētajam lietojumam. Šajā sakarā ir jāpārliecinās, ka dažādi preparāti nodrošina barjeras īpašības, piemēram, tie spēj saglabāt barjeru pret nekodīgām ķimikālijām, un tie dod iespēju ķimikāliju kodīgās īpašības iedalīt dažādajās ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās (1). Piešķirtā klasifikācija pamatojas uz laiku, kādā ķimikālija caur barjermembrānu nokļūst līdz indikatoršķīdumam.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

11. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo *in vitro* barjermembrānas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 2. tabulā ieteiktās 12 standartvielas. Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati (piem., vielu no references ķimikāliju saraksta (10)), ja vien tiek izmantoti tie paši 1. tabulā aprakstītie izraudzīšanās kritēriji.

2. tabula

Standartvielas ([1])

Viela ([2])	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase	*In Vivo* ANO *GHS* apakškategorija ([3])	*In Vitro* ANO *GHS* apakškategorija ([3])
Bora trifluorīddihidrāts	13319-75-0	Neorganiskas skābes	1A	1A
Slāpekļskābe	7697-37-2	Neorganiskas skābes	1A	1A
Fosfora pentahlorīds	10026-13-8	Neorganisko skābju prekursori	1A	1A
Valerilhlorīds	638-29-9	Skābju hlorīdi	1B	1B
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Neorganiskas bāzes	1B	1B

▼M8

Viela ([2])	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase	*In Vivo* ANO *GHS* apakškategorija ([3])	*In Vitro* ANO *GHS* apakškategorija ([3])
1-(2-aminoetil) piperazīns	140-31-8	Alifātiskie amīni	1B	1B
Benzolsulfonilhlorīds	98-09-9	Skābju hlorīdi	1C	1C
N, *N*-dimetilbenzilamīns	103-83-3	Anilīni	1C	1C
Tetraetilēnpentamīns	112-57-2	Alifātiskie amīni	1C	1C
Eigenols	97-53-0	Fenoli	NK	NK
Nonilakrilāts	2664-55-3	Akrilāti/metakrilāti	NK	NK
Nātrija bikarbonāts	144-55-8	Neorganiski sāļi	NK	NK

([1]) Iepriekš sarakstā norādītās divpadsmit vielas ietver trīs vielas no katras no trim ANO *GHS* kodīgo vielu apakškategorijām un trīs nekodīgas vielas, tās ir viegli pieejamas no komerciāliem piegādātājiem un ANO *GHS* apakškategorija ir balstīta uz rezultātiem, kas iegūti, veicot kvalitatīvu testēšanu *in vivo*. Šīs vielas izvēlētas no saraksta ar 40 standartvielām, kas iekļautas to ķimikāliju minimālajā sarakstā, kuras norādītas tādu testēšanas metožu pareizības un ticamības pierādīšanai, kuras ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai testēšanas referencmetodei, un kas atlasītas no 163 standartvielām, ko sākotnēji izmantoja testēšanas referencmetodes (*Corrositex*®) validēšanai (7) (10) (14). Minētās atlases mērķis bija, ciktāl iespējams, iekļaut ķimikālijas, kas: ir reprezentatīvas attiecībā uz tādu kodīguma atbildreakciju diapazonu (piem., nekodīgas; ANO iepakojuma grupu I, II un III kodīgas vielas), ko iespējams mērīt vai paredzēt ar validēto testēšanas referencmetodi; ir reprezentatīvas attiecībā uz validācijas procesos izmantotajām ķimikāliju klasēm; ir ar labi definētu ķīmisku struktūru; ar validēto testēšanas referencmetodi inducē reproducējamus rezultātus; *in vivo* referenctestā inducē skaidrus rezultātus; ir komerciāli pieejamas un ar tām nesaistās augstas likvidēšanas izmaksas (14).

([2]) Vielas, kas testētas tīrā veidā vai ar tīrību ≥ 90 %.

([3]) ANO *GHS* apakškategoriju 1A, 1B un 1C attiecīgās ANO iepakojuma grupas ir I, II un III. NK — nekodīgs.

PROCEDŪRA

12. Turpmākajos punktos aprakstīti kodīguma novērtēšanai paredzētās uz pašreizējo VRM, proti, komerciāli pieejamo *Corrositex*®, balstītās mākslīgas barjermembrānas testa metodes (7)(15) komponenti un procedūras. Barjermembrānu un saderības šķīdumus vai indikatoršķīdumus, kā arī šķīdumus, ko izmanto ķimikāliju kategorizēšanai, var izstrādāt, sagatavot vai iegūt tirdzniecībā, piemēram, VRM *Corrositex*® gadījumā. Validētajai testēšanas referencmetodei ir pieejams parauga testēšanas metodes protokols (7). Testēšana jāveic apkārtējās vides temperatūrā (17–25 °C), un komponentiem jāatbilst šādiem nosacījumiem.

Testējamās ķimikālijas saderības tests

13. Pirms barjermembrānas testa veikšanas veic saderības testu, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir detektējama ar *CDS*. Ja testējamo ķimikāliju ar *CDS* nevar detektēt, barjermembrānas testa metode nav piemērota konkrētās testējamās ķimikālijas iespējamā kodīguma izvērtēšanai un jāizmanto cita testēšanas metode. Saderības testā izmantotajai *CDS* un ekspozīcijas nosacījumiem jāatspoguļo ekspozīcija turpmākajā barjermembrānas testā.

Testējamās ķimikālijas laika skalas kategorijas tests

14. Ja testēšanas metode to ļauj, testējamai ķimikālijai, kas ir kvalificēta ar saderības testu, jāveic laika skalas kategorijas tests, proti, skrīninga tests, ko izmanto, lai nošķirtu vājas un stipras skābes vai bāzes. Piemēram, validētajā testēšanas referencmetodē laika skalas kategorizēšanas testu izmanto, lai atkarībā no tā, vai ir detektēta būtiska skābju vai sārmu rezerve, noteiktu,

▼M8

kura no divām laika skalām būtu jāizmanto. Kodīguma un ANO *GHS* kodīguma ādai apakškategorijas noteikšanai būtu jāizmanto divas atšķirīgas izlaušanās laika skalas atkarībā no testējamās ķimikālijas skābju vai sārmu rezerves.

BARJERMEMBRĀNAS TESTA METODES KOMPONENTI

Barjermembrāna

15. Barjermembrāna sastāv no diviem komponentiem: makromolekulāra ūdens proteīngela un caurlaidīgas pamatmembrānas. Proteīngelam jābūt šķidrumu un cietvielas necaurlaidīgam, taču tas var korodēties un kļūt caurlaidīgs. Gatavā barjermembrāna jāuzglabā iepriekš noteiktos apstākļos, kas novērš gela bojāšanos, piemēram, izžūšanu, mikrobu augšanu, tā nobīdi un plaisāšanu, kas varētu pasliktināt tā funkciju. Jānosaka pieļaujamais glabāšanas termiņš un barjermembrānas preparāti, ko pēc minētā termiņa neizmanto.

16. Caurlaidīgā pamatmembrāna nodrošina mehānisku balstu proteīngelam sarecēšanas procesā un eksponētību testējamajai ķimikālijai. Pamatmembrānai jānovērš gela noslīdēšana vai nobīde, un tai viegli jālaiž cauri visas testējamās ķimikālijas.

17. Proteīngels, kas sastāv no proteīna, piemēram, keratīna, kolagēna vai proteīnu maisījumiem, kuri veido gela matrici, kalpo par testējamās ķimikālijas mērķi. Proteīnmateriālu novieto uz pamatmembrānas virsmas, un pirms barjermembrānas novietošanas uz indikatoršķīduma tam ļauj sarecēt. Proteīngelam jābūt viscaur vienādi biezam un blīvam un bez gaisa burbuļiem vai defektiem, kas varētu ietekmēt tā funkcionālo integritāti.

Ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*)

18. Indikatoršķīdumam, kas ir tas pats šķīdums, ko izmanto saderības testā, būtu jāreaģē uz testējamās ķimikālijas klātbūtni. Jāizmanto pH indikatorkrāsviela vai krāsvielu kombinācija, piemēram, krezolsarkanais un metiloranžais, kas, reaģējot uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, maina savu krāsu. Mērīšanas sistēma var būt vizuāla vai elektroniska.

19. Lai noteiktu detektējamo ķimikāliju klāstu un detektēšanas kvantitatīvos ierobežojumus, jānovērtē, cik relevantas un ticamas ir detektēšanas sistēmas, kas izstrādātas, lai detektētu testējamās ķimikālijas iziešanu caur barjermembrānu.

TESTA NORISE

Testēšanas metodes komponentu montāža

20. Barjermembrānu ievieto ar indikatoršķīdumu pildītā mēģenē (vai caurulē) tā, lai pamatmembrāna pilnībā saskartos ar indikatoršķīdumu un nerastos gaisa burbuļi. Jāraugās, lai tiktu saglabāta barjeras integritāte.

▼M8

Testējamās ķimikālijas aplicēšana

21. Testējamo ķimikāliju pietiekamā daudzumā, piemēram, 500 µl šķidruma vai 500 mg smalki saberztas pulverveida cietvielas veidā (7), rūpīgi uzklāj uz barjermembrānas augšējās virsmas un vienmērīgi izkliedē. Katrai testējamajai ķimikālijai un to atbilstošajām kontrolēm (sk. 23.–25. punktu) sagatavo pietiekamu skaitu replikātu, piemēram, četrus (7). Reģistrē laiku, kad testējamā ķimikālija aplicēta uz barjermembrānas. Lai nodrošinātu, ka tiek precīzi reģistrēti īsi korozijas laiki, testējamās vielas replikātu mēģenēs aplicē dažādos laikos.

Barjermembrānas penetrācijas mērījumi

22. Katru mēģeni pienācīgi uzrauga, un reģistrē laiku, kad notikušas pirmās izmaiņas indikatoršķīdumā, t. i., barjeras penetrācija, un nosaka laika intervālu no aplicēšanas līdz barjermembrānas penetrācijai.

Kontroles

23. Testos, kuros testējamo ķimikāliju izmanto kopā ar nesēju vai šķīdinātāju, nesējam vai šķīdinātājam jābūt saderīgam ar barjermembrānas sistēmu, proti, tam nevajadzētu izjaukt barjermembrānas sistēmas integritāti un mainīt testējamās ķimikālijas kodīgumu. Attiecīgā gadījumā, lai noteiktu šķīdinātāja saderību ar barjermembrānas sistēmu, vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē šķīdinātāja (vai nesēja) kontrole.

24. Lai novērtētu, vai testēšanas sistēma darbojas pieņemami, vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē arī pozitīva (kodīga) kontrole ar vidēju kodīguma aktivitāti, piemēram, 110 ± 15 mg nātrija hidroksīda (ANO *GHS* 1.B kodīguma apakškategorija) (7). Lai izvērtētu kodīgas testējamās ķimikālijas relatīvo kodīguma potenciālu, var būt lietderīgi izmantot otru pozitīvo kontroli, kas pieder pie tās pašas ķimikāliju klases kā testējamā ķimikālija. Jāizvēlas vidēji kodīga pozitīvā kontrole vai kontroles (piemēram, ANO *GHS* 1.B apakškategorija), lai detektētu izmaiņas penetrēšanās laikā, kas var būt nepieņemami ilgāks vai īsāks par noteikto atsauces vērtību un tādējādi norādīt uz to, ka testēšanas sistēma nedarbojas pareizi. Ārkārtīgi kodīgas (ANO *GHS* 1.A apakškategorija) vai nekodīgas ķimikālijas šim nolūkam nav sevišķi lietderīgas. ANO *GHS* 1.B apakškategorijas ķimikālija ļautu detektēt pārāk garu vai īsu izlaušanās laiku. Lai noteiktu testēšanas metodes spēju konsekventi atšķirt vāji kodīgas un nekodīgas ķimikālijas, par pozitīvo kontroli var izmantot vāji kodīgu ķimikāliju (ANO *GHS* 1.C apakškategorija). Neatkarīgi no izmantotās pieejas jānosaka pieņemams pozitīvās kontroles atbildreakciju intervāls, kas balstīts uz izmantotās pozitīvās kontroles vai kontroļu izlaušanās laiku vēsturisko intervālu, piemēram, vidējās standartnovirzes ± 2-3. Lai varētu detektēt novirzes ārpus pieņemamā intervāla, katrā pētījumā jānosaka precīzs pozitīvās kontroles izlaušanās laiks.

25. Vienlaikus ar testējamo ķimikāliju jātestē arī negatīva (nekodīga) kontrole, piemēram, 10 % citronskābe, 6 % propionskābe (7), kas ir vēl viens kvalitātes kontroles līdzeklis, ar ko pierādīt barjermembrānas funkcionālo integritāti.

▼M8

Pētījuma pieņemamības kritēriji

26. Testējamās ķimikālijas kodīguma prognozēšanai izmanto laiku (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz barjermembrānas līdz barjeras penetrācijai, atbilstīgi katrai ANO *GHS* kodīguma apakškategorijai noteiktajiem laika parametriem. Lai pētījumu uzskatītu par pieņemamu, paralēlajai pozitīvajai kontrolei jāuzrāda sagaidāmais penetrēšanās atbildreakcijas laiks (piemēram, 8–16 minūtes ilgs izlaušanās laiks, ja par pozitīvo kontroli izmanto nātrija hidroksīdu), paralēlā negatīvā kontrole nedrīkst būt kodīga un paralēlā šķīdinātāja kontrole, ja tāda ir iekļauta, nedrīkst būt kodīga un tā nedrīkst mainīt testējamās ķimikālijas kodīguma potenciālu. Pirms šai testēšanas metodei atbilstošo metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, izmantojot 2. tabulā ieteiktās 12 vielas. Attiecībā uz jaunām atdarinājuma metodēm, kas izstrādātas saskaņā ar šo testēšanas metodi un ir strukturāli un funkcionāli līdzīgas validētajai referencmetodei (14), pirms jaunās metodes izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāpierāda tās ticamība un pareizība, šim nolūkam izmantojot iepriekš noteiktus veiktspējas standartus (10).

Rezultātu interpretēšana un testējamo ķimikāliju kodīguma klasifikācija

27. Testējamo ķimikāliju ANO *GHS* kodīguma apakškategorijās (1) un attiecīgā gadījumā ANO iekopojuma grupā (16) klasificē atbilstoši laikam (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas aplicēšanas barjermembrānai līdz barjeras penetrācijai. Katrai piedāvātajai testēšanas metodei nosaka laika sliekšņvērtības katrā no trim kodīguma apakškategorijām. Pieņemot galīgos lēmumus par laika sliekšņvērtībām, jāņem vērā nepieciešamība līdz minimumam samazināt korozijas briesmu pārāk zemas klasifikācijas (t. i., šķietami negatīvu rezultātu) skaitu. Pašreizējā testēšanās vadlīnijā jāizmanto metodes *Corrositex*® laika sliekšņvērtības, kas norādītās 3. tabulā, jo tā patlaban ir vienīgā testēšanas vadlīnijā ietvertā testēšanas metode (7).

3. tabula

Corrositex® prognozes modelis

Vidējais izlaušanās laiks (minūtēs)		ANO *GHS* prognoze ([3])
1. kategorijas testējamās ķimikālijas ([1]) (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	1. kategorijas testējamās ķimikālijas ([2]) (nosaka ar metodē paredzēto kategorizēšanas testu)	
0–3 min	0–3 min	Kodīgs fakultatīvā 1.A apakškategorija
> 3 līdz 60 min	> 3 līdz 30 min	Kodīgs fakultatīvā 1.B apakškategorija
> 60 līdz 240 min	> 30 līdz 60 min	Kodīgs fakultatīvā 1.C apakškategorija
> 240 min	> 60 min	Nekodīgs

([1]) Testējamās ķimikālijas ar lielu skābju/sārmu rezervi (6).
([2]) Testējamās ķimikālijas ar mazu skābju/sārmu rezervi (6).
([3]) ANO *GHS* 1.A, 1.B un 1.C apakškategorija atbilst attiecīgi ANO I, II un III iepakojuma grupai.

▼**M8**

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

28. Laiks (minūtēs), kas pagājis no testējamās ķimikālijas un pozitīvās kontroles vai kontroļu aplicēšanas līdz barjeras penetrācijai, jānorāda tabulā katram replikātam atsevišķi, kā arī jānorāda katra izmēģinājuma vidējā ± standartnovirze.

Testēšanas pārskats

29. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles vielas:

— vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un ja praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c.;

— daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām;

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— avots, sērijas numurs, ja zināms;

— testējamās ķimikālijas / kontrolvielas pirmstestēšanas apstrāde (piem., sildīšana, sasmalcināšana), ja tāda veikta;

— testējamās ķimikālijas stabilitāte, izmantošanas termiņš vai atkārtotas analīzes datums, ja tas zināms;

— glabāšanas apstākļi.

Nesējs:

— identifikācija, koncentrācija (attiecīgā gadījumā), izmantotais tilpums;

— nesēja izraudzīšanās pamatojums.

Izmantotais in vitro *barjermembrānas modelis un protokols, arī pierādīta pareizība un ticamība*

Testēšanas nosacījumi:

— izmantoto iekārtu un sagatavošanas procedūru apraksts;

— izmantotās *in vitro* barjermembrānas izcelsme un sastāvs;

— indikatoršķīduma sastāvs un īpašības;

— detektēšanas metode;

— testējamās ķimikālijas un kontroles vielas daudzumi;

— replikātu skaits;

— laika skalas kategorijas testa apraksts un pamatojums;

▼M8

— aplicēšanas metode;

— novērojumu laiki;

— izmantoto izvērtēšanas un klasificēšanas kritēriju apraksts;

— apliecināta kompetence testēšanas metodes veikšanā, kura pirms attiecīgās testēšanas metodes regulāras izmantošanas pierādīta, veicot standartķimikāliju testēšanu.

Rezultāti:

— tabulā apkopoti individuāli jēldati, kas iegūti no katra replikāta individuāliem testa un kontroles paraugiem;

— citas novērotās ietekmes apraksts;

— atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognozes modeli un/vai lēmuma pieņemšanas kritēriju.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Šā pielikuma B.4. nodaļa "Akūts ādas kairinājums/korozija".

(3) Šā pielikuma B.40a nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: rekonstruētas cilvēka epidermas *RHE* tests".

(4) Šā pielikuma B.40. nodaļa "Ādas korozija *in vitro*: transkutānā elektriskā pretestība (TEP)".

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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. Toxicology *In Vitro* 12, 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 (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and 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 10, 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 (No 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: 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. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Chapter B.46 of this Annex, *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Available at: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Available at: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼M8

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testēšanas metodes rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (9).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Ķimikāliju detektēšanas sistēma (*CDS*): vizuāla vai elektroniska mērīšanas sistēma, kurā izmanto indikatoršķīdumu, kas reaģē uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, piemēram, ar izmaiņām pH indikatorkrāsvielā vai krāsvielu kombinācijā, kam, reaģējot uz testējamās ķimikālijas klātbūtni, mainīsies krāsa, vai ar cita veida ķīmiskām vai elektroķīmiskām reakcijām.

Konkordantums: tādas testēšanas metodes veiktspējas mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "pareizība", ar to saprotot visu to testēto ķimikāliju īpatsvaru, kas pareizi klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas. Konkordantums lielā mērā ir atkarīgs no to pozitīvo rezultātu prevalences, kādi iegūti attiecībā uz pētāmajiem testējamo ķimikāliju veidiem (9).

***GHS* (Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma)**: sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

IATA: integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairākām vielām.

Vienkomponenta viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vismaz 80 % (masa/masa) veido viena galvenā sastāvdaļa.

Daudzkomponentu viela: tāda pēc kvantitatīvā sastāva definēta viela, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq$ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

NK: nekodīgs.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Tajos ietilpst i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī iii), uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — tādi paši pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar novērtējamo testēšanas metodi, to izvērtējot ar references vielām no minimālā saraksta (9).

▼M8

Relevantums: parametrs, kas raksturo testēšanas metodes un interesējošās ietekmes sakarību un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (9).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, kādu testēšanas metodi vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var izmantot reproducējami. To novērtē, aprēķinot iekšlaboratorisko un starplaboratorisko reproducējamību (9).

Jutība: tas, cik liela daļa visu pozitīvo/aktīvo ķimikāliju ar šo testēšanas metodi tiek pareizi kvalificētas. Tas ir tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Ādas korozija *in vivo*: neatgriezenisku ādas bojājumu rašanās; proti, redzama nekroze, kas caur epidermu skar zemādu un rodas, testējamo ķimikāliju aplicējot uz ādas uz laiku līdz četrām stundām. Tipiskas reakcijas uz kodīgumu ir čūlas, asiņošana, asiņainas kreveles un 14 dienu novērošanas perioda beigās — ādas izbalējuma radīta atkrāsošanās, ādas laukumi, kur izkritis apmatojums, un rētas. Neskaidros gadījumos bojājums jānovērtē histopatoloģiski.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testēšanas metodi tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (9).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼M8

B.66. STABILI TRANSFICĒTAS TRANSAKTIVĀCIJAS *IN VITRO* TESTI, AR KO KONSTATĒ ESTROGĒNU RECEPTORU AGONISTUS UN ANTAGONISTUS

VISPĀRĪGS IEVADS

ESAO rezultātbalstītas testēšanas vadlīnijas

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 455 (2016) aprakstītajam. TG 455 ir veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnija (PBTG), kurā aprakstīta stabili transficētas transaktivācijas *in vitro* testēšanas metodika, ar ko konstatē estrogēnu receptoru agonistus un antagonistus (ER TA testi). Tajā ietilpst vairākas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu estrogēnu receptora (t.i., ERα un/vai ERβ) agonistus un antagonistus, un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā par Bīstamības novērtēšanā izmantojamu jaunu vai atjauninātu testēšanas metožu validēšanu un starptautisku akceptēšanu (1). Pilnībā validētās references testēšanas metodes (2. un 3. papildinājums), kas ir šīs *PBTG* pamatā, ir šādas:

   — stabili transficētas TA (STTA) tests (2), izmantojot šūnu līniju (h) ERα-HeLa-9903; un

   — VM7Luc ER TA tests (3), izmantojot šūnu līniju VM7Luc4E2 ([1]), kur galvenokārt ir ekspresēta līnija hERα un daļēji hERβ(4)(5).

   Līdzīgu testu izstrādē, kas vērsti uz to pašu apdraudējumu/iznākumu, ir pieejami un būtu jāizmanto snieguma standarti (PS) (6) (7). Tas dod iespēju savlaicīgi grozīt *PBTG* 455, proti, atjauninātu *PBTG* papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem; tomēr līdzīgus testus pievienos tikai pēc izskatīšanas un apstiprināšanas ESAO, ka snieguma standarti ir izpildīti. TG 455 iekļautos testus tam, lai izpildītu ESAO valstu prasības pēc estrogēnu receptora transaktivācijas testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas par potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju skrīningu un testēšanu. ESAO

([1]) Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (35), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (36). Salīdzinoši nesen atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (37) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (38), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 ("V" = variants; "M7" = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķimikāliju skrīningā.

▼**M8**

konceptuālais satvars (KS) potenciāli endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju testēšanai un novērtēšanai 2012. gadā tika pārskatīts. Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā ESAO Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķimikāliju vērtēšanai attiecībā uz endokrīnajiem disruptoriem (8). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER transaktivācijas (TA) testi atbilst 2. līmenim, kur ietilpst "*in vitro testi, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem*". Šī testēšanas metode ir paredzēta *in vitro* transaktivācijas testiem, ar ko identificē estrogēnu receptoru (ER) agonistus un antagonistus.

3. Estrogēnu un ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulētos gēnus, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tie, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (9)(10)(11). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontoģenēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti.

4. *In vitro* TA testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru, kas regulē reportiergēna produkta transkripciju. Šādi testi ir plaši izmantoti, lai izvērtētu gēnu ekspresiju, ko regulē specifiski nukleārie receptori, piem., ER (12) (13) (14) (15) (16). Ir ierosināts, ka tos varētu izmantot, lai detektētu estrogēnisku transaktivāciju, ko regulē ER (17) (18) (19). Pastāv vismaz divi lieli nukleāro ER apakštipi: α un β, un tos kodē atšķirīgi gēni. Attiecīgajiem proteīniem ir atšķirīgas bioloģiskās funkcijas, kā arī atšķirīgs sadalījums audos un atšķirīga ligandu afinitāte (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). Nukleārais ERα mediē klasisko estrogēnisko reakciju (27)(28)(29)(30), tāpēc vairums modeļu, ko pašlaik izstrādā ER aktivācijas vai inhibīcijas mērīšanai, balstās uz ERα. Testus izmanto, lai identificētu ķimikālijas, kas aktivē (vai inhibē) ER ar liganda piesaisti, pēc kuras receptora-liganda komplekss piesaistās specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu, kā rezultātā palielinās marķierproteīna ekspresija šūnās. Testos var izmantot dažādas reportiergēnu reakcijas. Uz luciferāzes balstītās sistēmās luciferāzes enzīms luciferīna substrātu pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Citi izplatīti marķieri ir fluorescējošais proteīns un *LacZ* gēns, kas kodē β-galaktozidāzi — enzīmu, kas bezkrāsaino substrātu X-gal (5- brom-4-hlor-indolil-galaktopiranozīdu) pārveido zilā produktā, ko var kvantificēt ar spektrofotometru. Šos marķierus var ātri un lēti izvērtēt ar komerciāli pieejamiem testa komplektiem.

5. STTA un VM7Luc TA testu validācijas pētījumi apliecina, ka šie testi ir ticami un relevanti konkrētajam nolūkam (3)(4)(5)(30). Veiktspējas standarti uz luminiscenci balstītiem ER TA testiem, kuros izmanto krūšu šūnas, ir iekļauti ziņojumā 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). Šie veiktspējas standarti ir grozīti tā, lai tos varētu izmantot gan STTA, gan VM7Luc TA testiem (2).

6. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

▼M8

TA testu tvērums un ierobežojumi

7. Šos testus ierosināts izmantot skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī mehānistisku informāciju, ko var izmantot pierādījumu izsvēršamas pieejā. Tie attiecas uz TA, ko inducē ķīmiska piesaiste ER *in vitro* sistēmā. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.

8. Uzskata, ka ER mediēta TA ir viens no nozīmīgākajiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan ED izraisa arī citi mehānismi, t. sk. i) mijiedarbība ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un enzīmu sistēmām, ii) hormonu sintēze, iii) hormonu metaboliskā aktivācija/inaktivācija, iv) hormonu sadalījums mērķaudos un v) hormonu izvadīšana no organisma. Neviens pie šīs testēšanas metodes apskatītais tests neattiecas uz šiem darbības modiem.

9. Šī testēšanas metode attiecas uz ķimikāliju spēju aktivēt (t. i., darboties kā agonistam) un nomākt (t. i., darboties kā antagonistam) ER regulētu transkripciju. Dažas ķimikālijas — atkarībā no izmantotajām šūnām — var iedarboties gan kā agonisti, gan kā antagonisti, un tās sauc par selektīvajiem estrogēnu receptora modulatoriem (SERM). Ja ķimikālijas šajos testos uzrāda negatīvus rezultātus, tad, pirms izdarīt secinājumu, ka tās receptoram nepiesaistās, tās varētu būt lietderīgi novērtēt ER piesaistīšanas testos. Turklāt šie testi sniedz tikai informāciju par vecākmolekulas aktivitāti, ņemot vērā *in vitro* šūnu sistēmu ierobežotās metabolizēšanas spējas. Tā kā validācijas pētījumā tika izmantotas tikai atsevišķas vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr šī testēšanas metode teorētiski ir piemērojama daudzkomponentu vielu, UVCB un maisījumu testēšanai. Pirms datu iegūšanai normatīvām vajadzībām šo testēšanas metodi izmanto attiecībā uz daudzkomponentu vielu, UVCB vai maisījumu, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

10. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti agonista testa rezultāti 34 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 26 nešaubīgi klasificētas kā ER agonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 8 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos un/vai uterotrofiskajā testā (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). 2. tabulā ir sniegti antagonista testa rezultāti 15 vielām, kas testētas ar abām pilnībā validētajām references testēšanas metodēm, kuras aprakstītas šajā testēšanas metodē. No šīm vielām 4 nešaubīgi/potenciāli klasificētas kā ER antagonisti, un, kā iziet no publicētajiem pārskatiem, 10 vielas uzrādīja negatīvus rezultātus, t. sk. *in vitro* ER piesaistes un TA testos (2)(3)(18)(31). Runājot par 1. un 2. tabulā apkopotajiem datiem, abas references testēšanas metodes ļauj izdarīt 100 % vienādus secinājumus par visu vielu klasifikāciju (izņemot vienu vielu — mifepristonu — antagonista testā), un katra viela ir pareizi klasificēta kā ER agonists/antagonists vai negatīvs rezultāts. Papildu informācija par šo ķimikāliju grupu un par vēl citām ķimikālijām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas STTA VM7Luc ER TA testos, ir sniegta ERTA veiktspējas standartu (6)(7), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabula).

▼M8

1. tabula

Pārskats par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos agonista testos un klasificētas kā ES agonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela	*CAS* Nr.	STTA tests (1)			VM7Luc ER TA tests (2)		Klasifikācijas datu avots (4)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (3) (M)	Citi ER TA testi (c)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
1	17ß-estradiols (a)	50-28-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POZ (227/227)	POZ	POZ
2	17α-estradiols (a)	57-91-0	POZ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POZ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POZ (11/11)	POZ	POZ
3	17α-etinilestradiols (a)	57-63-6	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POZ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POZ (22/22)	POZ	POZ
4	17β-trenbolons	10161-33-8	POZ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POZ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POZ (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterons (a)	434-22-0	POZ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POZ (4/4)	POZ	POZ
6	4-kumilfenols (a)	599-64-4	POZ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POZ (5/5)	POZ	NT
7	4-*terc*-oktilfenols (a)	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POZ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POZ (21/24)	POZ	POZ
8	Apigenīns (a)	520-36-5	POZ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POZ (26/26)	POZ	NT
9	Atrazīns (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenols A (a)	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POZ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POZ (65/65)	POZ	POZ
11	Bisfenols B (a)	77-40-7	POZ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POZ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (6/6)	POZ	POZ
12	Butilbenzilftalāts (a)	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POZ (12/14)	POZ	NEG

▼M8

	Viela	*CAS* Nr.	STTA tests (1)			VM7Luc ER TA tests (2)		Klasifikācijas datu avots (4)		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība (b), (3) (M)	Citi ER TA testi (c)	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
13	Kortikosterons (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Kumestrols (a)	479-13-0	POZ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POZ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POZ (30/30)	POZ	NT
15	Daidzeīns (a)	486-66-8	POZ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POZ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POZ (39/39)	POZ	POZ
16	Dietilstilbestrols (a)	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POZ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POZ (42/42)	POZ	NT
17	Di-n-butilftalāts	84-74-2	POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POZ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POZ (6/11)	POZ	NEG
18	Etilparabēns	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	PC_{50} nav	POZ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POZ		NT
19	Estrons (a)	53-16-7	POZ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POZ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POZ (26/28)	POZ	POZ
20	Genisteīns (a)	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POZ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POZ (100/102)	POZ	POZ
21	Haloperidols	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kampferols (a)	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POZ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POZ (23/23)	POZ	NT
23	Kepons (a)	143-50-0	POZ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POZ (14/18)	POZ	NT
24	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linurons (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*mezo*-heksestrols (a)	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POZ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POZ (4/4)	POZ	NT
27	Metiltestosterons (a)	58-18-4	POZ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POZ (5/6)	POZ	NT

▼M8

	Viela	*CAS* Nr.	STTA tests ([1])			VM7Luc ER TA tests ([2])		Klasifikācijas datu avots ([4])		
			ER TA aktivitāte	PC_{10} vērtība (M)	PC_{50} vērtība ([b]) (M)	ER TA aktivitāte	EC_{50} vērtība ([b]), ([3]) (M)	Citi ER TA testi ([c])	ER piesaistes testi	Uterotrofiskie testi
28	Morīns	480-16-0	POZ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POZ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POZ (2/2)	POZ	NT
29	Noretinodrels ([a])	68-23-5	POZ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POZ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POZ (5/5)	POZ	NT
30	*p,p'*-metoksihlors ([a])	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(PC_{50} nav) ([a])	POZ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POZ (24/27)	POZ	POZ
31	Fenobarbitāls ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
32	Rezerpīns	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolaktons ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosterons	58-22-0	POZ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POZ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POZ (5/10)	POZ	NT

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; NT = nav testēts; PC_{10} (un PC_{50}) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC_{50} gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

([a]) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER agonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tabula 4-1 (3)).

([b]) Maksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1×10^{-5} M (STTA) un 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA).

([c]) Skaitļi iekavās norāda pozitīvo (POZ) vai negatīvo (NEG) rezultātu skaitu attiecībā pret kopējo references pētījumu skaitu.

([1]) Vērtības, par kurām ziņots dokumentā "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 (2)".

([2]) 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]) Vidējās EC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratroijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

([4]) Vielas klasificētas ER agonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Piezīmes. Pie šīs testēšanas metodes aprakstītajos testos netiek izmantoti tie paši mērījumi. Dažos gadījumos EC_{50} nav iespējams aprēķināt, jo nav ģenerēta pilna devas-efekta līkne. Lai gan STTA testā galvenais mērījums ir PC_{10} vērtība, ir iespējami vēl citi gadījumi, kur derīgu informāciju sniedz PCx vērtība.

▼M8

2. tabula

Salīdzinājums par STTA un VM7Luc ER TA testu rezultātiem attiecībā uz vielām, kas testētas abos antagonista testos un klasificētas kā ES antagonisti (POS) vai kā negatīvi rezultāti (NEG)

	Viela (a)	*CAS* Nr.	ER STTA tests (1)		VM7Luc ER TA tests (2)		ER STTA sagaidāmie rezultāti (4)	ICCVAM (5) saskaņotā klasifikācija	MeSH (6) ķimikāliju klase	Produktu klase (7)
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība (b), (3) (M)				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3,97 \times 10^{-9}$	POZ	$2,08 \times 10^{-7}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
2	Dibenz[a,h]antracēns	53-70-3	POZ	Nav IC_{50}:	POZ	Nav IC_{50}:	POZ	PP	Policiklisks savienojums	Laboratoriju ķimikālija, dabisks produkts
3	Mifepristons	84371-65-3	POZ	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	vāji POZ	NEG	Steroīds	Farmaceitisks līdzeklis
4	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7,86 \times 10^{-10}$	POZ	$1,19 \times 10^{-9}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
5	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4,91 \times 10^{-7}$	POZ	$8,17 \times 10^{-7}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
6	17β-estradiols	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis

▼M8

	Viela ([a])	*CAS* Nr.	ER STTA tests ([1])		VM7Luc ER TA tests ([2])		ER STTA sagaidāmie rezultāti ([4])	ICCVAM ([5]) saskaņotā klasifikācija	MeSH ([6]) ķimikāliju klase	Produktu klase ([7])
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]) (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigenīns	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterociklisks savienojums	Krāsviela, dabisks produkts, farmaceitisks starpprodukts
8	Atrazīns	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterociklisks savienojums	Herbicīds
9	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Esteris, ftalskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciska ķimikālija, plastifikators
10	Fenarimols	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nav testēts;	PN	Heterociklisks savienojums, pirimidīns	Fungicīds
11	Flavons	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
12	Flutamīds	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
13	Genisteīns	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis

▼M8

	Viela (a)	*CAS* Nr.	ER STTA tests (1)		VM7Luc ER TA tests (2)		ER STTA sagaidāmie rezultāti (4)	ICCVAM (5) saskaņotā klasifikācija	MeSH (6) ķimikāliju klase	Produktu klase (7)
			ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība (b) (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} vērtība (b), (3) (M)				
14	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nav testēts	NEG	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts
15	Resveratrols	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Dabisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs; PP = pieņem, ka pozitīvs.

(a) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

(b) Maksimālā koncentrācija, kas testēta bez ierobežojumiem citotoksicitātes vai nešķīdības dēļ, bija 1×10^{-3} M (STTA) un 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(2) 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) Vidējās IC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

(4) ER STTA gaidāmā aktivitāte, pamatojoties uz to zināmo ietekmi, kas secināma no CERI vēsturiskajiem datiem par ER receptoru testu un uterotrofisko testu un no informācijas, kas apkopota brīvpieejamā literatūrā (2)

(5) Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

(6) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(7) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ER TA TESTA KOMPONENTI

Nepieciešamie testa komponenti

11. Šo testēšanas metodi piemēro testiem, kuros izmanto stabili transficētu vai endogēnisku ERα receptoru un stabili transficētu reportiergēnu konstruktu viena vai vairāku estrogēniskas reakcijas elementu kontrolē; tomēr klātesoši var būt arī citi receptori, piemēram, ERβ. Tie ir nepieciešamie testa komponenti.

Kontroles

12. Apraksta ierosinātos paralēlos references standartus katram agonista un antagonista testam. Paralēlās kontroles (negatīvs, šķīdinātājs, pozitīvs) vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests funkcionē pie testēšanas nosacījumiem, un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti tie ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1).

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

13. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka šūnu līnija vairāku pasāžu gaitā saglabājas stabila, nesatur mikoplazmu (t.i., nav kontaminēta ar baktērijām) un saglabā spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER mediētās reakcijas. Jāpārbauda arī, vai šūnu līnijas identitāte ir pareiza un vai nav citu kontaminantu (piem., sēnīšu, raugu un vīrusu).

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

14. Pirms nezināmu ķimikāliju testēšanas ar kādu no šajā testa metodē aprakstītajiem testiem katrai laboratorijai ir jāpierāda sava kompetence testa izmantošanā. Kompetences pierādīšanas labad katra laboratorija testē 14 standartvielas, ko izmanto agonistu testēšanā un kas norādītas 3 tabulā, un 10 standartvielas, ko izmanto antagonistu testēšanā un kas norādītas 4. tabulā. Kompetences pierādīšana arī ļauj pārliecināties par testa sistēmas reaģētspēju. Standartvielu testēšanas saraksts ir daļa no references vielām, kas norādītas ER TA testu veiktspējas standartos (6). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas, tās ir reprezentatīvas tādu ķimikāliju klasēm, ko parasti saista ar ER agonistu vai antagonistu aktivitāti, tām ir pienācīgs potences diapazons, kas sagaidāms no ER agonistiem/antagonistiem (t.i., no spēcīga līdz vājam) un tās ietver negatīvas vielas. Standartvielas testē vismaz divas reizes dažādās dienās. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi. Atkarībā no šūnu tipa dažas standartvielas var izpausties kā SERM, proti, gan kā agonisti, gan kā antagonisti. Tomēr standartvielas 3. un 4. tabulā ir klasificētas pēc to zināmās dominējošās aktivitātes, un tieši pēc tās vadās kompetences izvērtēšanā.

15. Kompetences pierādīšanas un kvalitātes kontroles vajadzīgām katra laboratorija izveido agonistu un antagonistu vēsturisko datubāzi ar šādiem datiem: references standartvielas (piem., 17β-estradiols un tamoksifēns), pozitīvās un negatīvās kontrolķimikālijas un šķīdinātāja kontrole (piem., DMSO). Sākumā datubāzi ģenerē no vismaz 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar agonistiem (piem., 17β-estradiolu) un 10 neatkarīgām testa izpildes reizēm ar antagonistiem (piem., tamoksifēnu). Lai datubāzi paplašinātu un tādējādi nodrošinātu laboratorijas konsekventu sniegumu un kompetenci biotestu veikšanā, datubāzi papildina ar vēlāku references standartvielu un šķīdinātāja kontroļu analīžu rezultātiem.

▼M8

3. tabula

Saraksts ar (14) standartvielām, ko izmanto agonistu testā [1]

Nr. [8]	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija [2]	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase [6]	Produktu klase [7]
				PC_{10} vērtība (M) [3]	PC_{50} vērtība (M) [3]	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) [4]	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) [5]		
14	Dietilstilbestrols	56-53-1	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} – 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis, veterinārfarmaceitisks līdzeklis
12	17α-estradiols	57-91-0	POZ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
15	*mezo*-heksestrols	84-16-2	POZ	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
11	4-*terc*-oktilfenols	140-66-9	POZ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts
9	Genisteīns	446-72-0	POZ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
6	Bisfenols A	80-05-7	POZ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts

▼M8

Nr. ([8])	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija ([2])	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase ([6])	Produktu klase ([7])
				PC_{10} vērtība (M) ([3])	PC_{50} vērtība (M) ([3])	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) ([4])	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) ([5])		
2	Kampferols	520-18-3	POZ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts
3	Butilbenzilftalāts	85-68-7	POZ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karbonskābe, esteris, ftalskābe	Plastifikators, rūpnieciska ķimikālija
4	*p,p*'- metoksihlors	72-43-5	POZ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Ogļūdeņradis (halogenēts)	Pesticīds, veterinārfarmaceitisks līdzeklis
1	Etilparabēns	120-47-8	POZ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karbonskābe, fenols	Farmaceitisks līdzeklis
17	Atrazīns	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterociklisks savienojums	Herbicīds
20	Spironolaktons	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktons, steroīds	Farmaceitisks līdzeklis
21	Ketokonazols	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterociklisks savienojums	Farmaceitisks līdzeklis

▼M8

Nr. ([8])	Viela	*CAS* Nr.	Sagaidāmā reakcija ([2])	STTA tests			VM7Luc ER TA tests		MeSH ķimikāliju klase ([6])	Produktu klase ([7])
				PC_{10} vērtība (M) ([3])	PC_{50} vērtība (M) ([3])	Testa koncentrācijas diapazons (M)	VM7Luc EC_{50} vērtība (M) ([4])	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) ([5])		
22	Rezerpīns	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} – 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterociklisks savienojums, indols	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs EC_{50} = testējamās vielas 50 % efektīvā koncentrācija; NEG = negatīvs; POZ = pozitīvs; PC_{10} (un PC_{50}) = testējamās vielas koncentrācija, pie kuras aktivitāte ir 10 % (vai 50 % PC_{50} gadījumā) no aktivitātes, ko izraisa pozitīvs rezultāts (E2, 1nM) katrā platē.

([1]) Vielas klasificētas kā pozitīvas vai negatīvas ER agonista aspektā, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (31), empīriskiem datiem un informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Vērtības, par kurām ziņots dokumentā "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 (30)".

([3]) Vidējās EC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

([4]) Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķīrās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-10 dokumentā "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]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Saskaņā ar veiktspējas standartu (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) 1. tabulu (6).

([8]) Ja standartviela vairs nav komerciāli pieejama, var izmanot vielu, kurai ir tāda pati klasifikācija un salīdzināma potence, darbības mods un ķīmiskā klase.

▼M8

4. tabula

Saraksts ar (10) standartvielām, ko izmanto antagonistu testā

	Viela [a]	*CAS* Nr.	ER STTA tests [1]			VM7Luc ER TA tests [2]			ER STTA [1] sagaidāmie rezultāti	ICCVAM [5] saskaņotā klasifikācija	MeSH [6] ķimikāliju klase	Produktu klase [7]
			ER TA aktivitāte	IC_{50} (M)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} [3] (M)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) [4]				
1	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	POZ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POZ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
2	Raloksifēns HCl	82640-04-8	POZ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POZ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	mēreni POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
3	Tamoksifēns	10540-29-1	POZ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POZ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POZ	POZ	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Farmaceitisks līdzeklis
4	17β-estradiols	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	potenciāli negatīvs (*)	PN	Steroīds	Farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
5	Apigenīns	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterociklisks savienojums	Krāsviela, dabisks produkts, farmaceitisks starpprodukts
6	Di-n-butilftalāts	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Esteris, ftalskābe	Kosmētikas līdzekļu sastāvdaļa, rūpnieciska ķimikālija, plastifikators

▼M8

	Viela (a)	*CAS* Nr.	ER STTA tests (1)			VM7Luc ER TA tests (2)			ER STTA (1) sagaidāmie rezultāti	ICCVAM (5) saskaņotā klasifikācija	MeSH (6) ķimikāliju klase	Produktu klase (7)
			ER TA aktivitāte	IC_{50} (M)	Testa koncentrācijas diapazons (M)	ER TA aktivitāte	IC_{50} (3) (M)	Augstākā koncentrācija diapazona noteikšanai (M) (4)				
7	Flavons	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	PN	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	NEG	Flavonoīds, heterociklisks savienojums	Dabisks produkts, farmaceitisks līdzeklis
9	p-n-nonilfenols	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	nav testēts	NEG	Fenols	Ķimikāliju starpprodukts
10	Resveratrols	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	potenciāli negatīvs (*)	NEG	Ogļūdeņradis (ciklisks)	Dabisks produkts

Saīsinājumi: CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs M = molārs; EC_{50} = testējamās vielas 50 % maksimālā inhibējošā koncentrācija; NEG = negatīvs; PN = pieņem, ka negatīvs; POZ = pozitīvs.

(*) klasificēts kā negatīvs saskaņā ar literatūras apskatu (2).

(a) Izplatītas vielas, kas testētas STTA un VM7Luc ER TA testos un klasificētas kā ER antagonisti vai negatīvi, un izmantotas, lai novērtētu VM7Luc ER TA validācijas pētījuma pareizību (2) (3).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

(2) 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) Vidējās IC_{50} vērtības aprēķinātas, izmantojot vērtības, ko paziņoja laboratorijas, kas iesaistītas VM7Luc ER TA validācijas pētījumā (*XDS*, *ECVAM* un *Hiyoshi*) (3).

(4) Norādītās koncentrācijas atbilst augstākajām testētajām koncentrācijām (diapazona noteikšanas tests) VM7Luc ER TA testa validēšanas gaitā. Ja dažādās laboratorijās koncentrācijas atšķīrās, norādīta augstākā koncentrācija. Sk. tabulu 4-11 dokumentā "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) Vielas klasificētas ER antagonisti vai negatīvi, pamatojoties uz informāciju dokumentos "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and test methods" (31), kā arī uz informāciju publikācijās, kas publicētas un recenzētas pēc ICCVAM BRDs (2) (3) (18) (31).

(6) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(7) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Testa pieņemamības kritēriji

16. Testa pieņemšana vai noraidīšana ir atkarīga no rezultātiem, kas iegūti ar katrā eksperimentā izmantotajiem references standartiem un kontrolēm. References standartvielu vērtībām PC_{50} (EC_{50}) vai IC_{50} būtu jāatbilst pieņemamības kritērijiem, kas paredzēti izvēlētajam testam (par STTA sk. 2. papildinājumu, par VM7Luc ER TA sk. 3. papildinājumu), un visas pozitīvās/negatīvās kontroles būtu pareizi jāklasificē attiecībā uz katru eksperimentu, kas atzīts par pieņemamu. Laboratorija savu spēju pastāvīgi veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot datubāzi, kurā apkopoti references standartvielu un kontroļu vēsturiskie rezultāti (sk. 15. punktu). Kā pasākumu, ar ko nodrošina reproducējamību laboratorijas robežās, var izmantot references standartu līknes piemeklēšanas parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi.

— Datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER aktivāciju (agonistu testā) vai inhibīciju (antagonistu testā) (t.i., efektivitāti un potenci).

— Lai garantētu adekvātu jutību, marķiera vidējai aktivitātei pie references estrogēna references koncentrācijas jābūt vismaz testēšanas metodes paredzētajai minimālajai aktivitātei attiecībā pret nesēja (šķīdinātāja) kontroles marķiera vidējo vērtību. Testos STTA un VM7Luc ER TA šī minimālā vērtība ir četras reizes lielāka par nesēja kontroles vidējo vērtību katrā platē.

— Testētajām koncentrācijām jāsaglabājas testa ķimikāliju šķīdības diapazonā un tās nedrīkst būt citotoksiskas.

Datu analīze

17. Lai noteiktu, vai reakcija ir pozitīva vai negatīva, izmanto katram testam definēto datu interpretēšanas procedūru.

18. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (16. punkts), tas nozīmē, ka tests darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu replicēšana. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., rezultāti abās izpildes reizēs liecina, ka testa ķimikālija ir pozitīva), nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi.

19. Ja divās izpildes reizēs netiek netiek iegūti reproducējami rezultāti (piem., testa ķimikālija ir pozitīva vienā izpildes reizē, bet negatīva otrā) vai ka ir nepieciešama lielāka pārliecība par šā testa iznākumu, vajadzīgas vismaz trīs neatkarīgas izpildes reizes. Tādā gadījumā klasifikācijas pamatā ir divi sakritīgie rezultāti no trim.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

20. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER TA datus. Tomēr gan kvalitatīvajos (piem., pozitīvs/negatīvs), gan kvantitatīvajos (piem., EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) ER mediētās aktivitātes novērtējumos ir jābalstās uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem. Ja iespējams, pozitīvie rezultāti jāraksturo gan ar ietekmes intensitāti salīdzinājumā ar nesēja (šķīdinātāja) kontroli vai references estrogēnu, gan ar koncentrāciju, pie kuras novērojama ietekme (piem., EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} u.c.).

▼M8

Testēšanas pārskats

21. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Tests:

— izmantotais tests,

— kontrole/ references standarts/ testējamā ķimikālija,

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja tā zināma,

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela.

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs/nesējs:

— raksturojums (iedaba, piegādātājs un sērija),

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā zināma.

Šūnas:

— šūnu tips un avots:

  • Vai ER ir endogēniski ekspresēts? Ja nē, tad kuri receptori tikuši transficēti?

  • Izmantotie reportiergēnu konstrukti (t.sk. avotsugas);

  • Transfekcijas metode;

  • Atlases metode, ko izmanto stabilas transfekcijas uzturēšanai (attiecīgā gadījumā);

  • Vai transfekcijas metode ļauj iegūt stabilas līnijas?

— šūnu pasāžu skaits (pēc atkausēšanas);

▼**M8**

— šūnu pasāžu skaits (atkausēšanas brīdī);

— šūnu kultūru audzēšanas metodes.

Testēšanas nosacījumi:

— šķīdības ierobežojumi;

— apraksts par izmantotajām dzīvotspējas novērtēšanas metodēm;

— Barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija;

— testējamās ķimikālijas koncentrācija;

— pievienotā nesēja un testējamās ķimikālijas tilpums;

— inkubācijas temperatūra un mitrums;

— apstrādes ilgums;

— šūnu blīvums apstrādes sākumā un gaitā;

— pozitīvie un negatīvie references standarti;

— marķierreaģenti (produkta nosaukums, piegādātājs, sērija);

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

— indukcija kārtās katrā testa platē un tas, vai tiek izpildīts testā vajadzīgais minimums, pamatojoties uz vēsturiskajiem datiem par kontrolēm;

— pieņemamības kritēriju faktiskās vērtības, piem., $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ un Hilla virziena koeficienta vērtības attiecībā uz testā paralēli iekļautajām pozitīvajām kontrolēm/references standartiem.

Rezultāti:

— jēldati un normalizēti dati;

— maksimālais vairākkāršās indukcijas līmenis;

— dati par citotoksicitāti;

— zemākā iedarbīgā koncentrācija (LEC), ja tāda ir;

— attiecīgā gadījumā — RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} un/vai EC_{50} vērtības;

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

▼**M8**

— statistiskās analīzes (ja tādas ir), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., SEM, SN, VK vai 95 % CI) un apraksts par to, kā šīs vērtības iegūtas.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(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.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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 (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and 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, 13(1): p. 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 (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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 (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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 (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 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, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 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, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 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, 126(2): p. 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,28(1): p. 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,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 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, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERSTARTSYMBOLFONT003FENDSYMBOLFONTSTARTSYM-BOLFONT003FENDSYMBOLFONT*In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 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,82(12): p. 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, 299(2): p. 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, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 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, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 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., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 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, 34, 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. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and 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. 13, 67-82.

▼M8

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

Agonists: viela, kas piesaistē konkrētam receptoram rada reakciju, piemēram, transkripciju.

Antagonists: tāda veida receptora ligands vai ķimikālija, kas piesaistē receptoram pats(-i) par sevi neizraisa bioloģisku reakciju, bet gan bloķē vai mīkstina agonista mediētas reakcijas.

Antiestrogēniska aktivitāte: ķimikālijas spēja nomākt 17β-estradiola aktivitāti, ko mediē estrogēnu receptori.

Šūnu morfoloģija: tādu šūnu forma un izskats, kas monoslānī audzētas audu kultūras plates vienā iedobē. Mirstošām šūnām bieži novērojama anormāla šūnu morfoloģija.

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķimikāliju testēšanai un novērtēšanai.

Apstrāde ar ogli/dekstrānu: šūnu kultūrā izmantota seruma apstrāde. Apstrāde ar ogli/dekstrānu (bieži vien to sauc arī par "stripingu") likvidē endogēniskos hormonus un hormonus piesaistošus proteīnus.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Citotoksicitāte: kaitīga ietekme uz šūnas struktūru vai funkcionalitāti, kas galu galā var novest pie šūnas nāves; to var atspoguļot šūnu skaita samazinājums iedobē ekspozīcijas perioda beigās vai šūnu funkcijas kapacitātes samazinājums salīdzinājumā ar paralēlo nesēja kontroli.

VK: variācijas koeficients.

DCC-FBS: liellopu embriju serums, kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli.

DMEM: Dulbeko modificētā Īgla barotne.

DMSO: dimetilsulfoksīds.

E2: 17β-estradiols.

EC50: testējamās ķimikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

ED: endokrīnās sistēmas darbības traucējumi.

hERα: cilvēka estrogēnu receptors alfa

▼**M8**

hERß: cilvēka estrogēnu receptors beta

EFM: bezestrogēna barotne. Dulbeko modificētā Īgla barotne (DMEM), kas papildināta ar 4,5 % DCC-FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % penicilīna un streptomicīna maisījumu.

ER: estrogēna receptors

ERE: estrogēna atbildreakcijas elements

Estrogēniska aktivitāte: ķimikālijas spēja imitēt 17β-estradiolu, proti, piesaistīties estrogēnu receptoriem un aktivēt tos. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt hERα mediētu estrogēnisku aktivitāti.

ERTA: estrogēna receptora transaktivācija

FBS: liellopu embriju serums

HeLa: nemirstīga cilvēka dzemdes kakla šūnu līnija

HeLa9903: HeLa šūnu apakšklons, kurā stabili transficēts hERαα un luciferāzes reportiergēns

IC_{50}: testējamās inhibējošās ķimikālijas 50 % iedarbīgā koncentrācija.

ICCVAM: Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par interlaboratoriju reproducējamību) nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par intralaboratoriju reproducējamību (1).

LEC: zemākā iedarbīgā koncentrācija, t.i., zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t.i., testa ķimikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcija kārtās ir statistiski atšķirīga no paralēlās nesēja kontroles).

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi aizstājama ar līdzīgu testēšanas metodi.

MT: metalotionīns

MMTV: peļu piena dziedzeru audzēja vīruss

OHT: 4-hidroksitamoksifēns

PBTG: veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnijas

▼**M8**

(**PC**) Pozitīvā kontrole:: ļoti aktīva viela — vēlams, 17ß-estradiols —, ko iekļauj visos testos un kas palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

PC_{10}: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 10 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (testā STTA — E2 pie 1nM) katrā iedobē.

PC_{50}: testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras izmērītā aktivitāte agonista testā ir 50 % no maksimālās aktivitātes, ko inducē PC (E2 pie testēšanas metodē norādītās references koncentrācijas) katrā iedobē.

PC_{Max}: testējamās ķimikālijas koncentrēšana, kas inducē RPCMax

Veiktspējas standarti: uz validēta testa bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķimikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veiktspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testēšanas metodi. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un un par to pie pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja testu pienācīgi veikt.

References estrogēns (pozitīvā kontrole, PC): 17β-estradiols (E2, CAS 50-28-2).

References standarts: references viela, ko izmanto, lai pierādītu testa piemērotību. Testos STTA un VM7Luc ER TA references standarts ir 17β-estradiols.

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās *PBTG* 455.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

RLU: relatīvās gaismas vienības

RNS: ribonukleīnskābe

RPC_{Max}: testējamās ķimikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis, ko izsaka kā procentus no 1nM, E2 inducētās atbildreakcijas tajā pašā platē.

▼M8

RPMI: RPMI 1 640 barotne, kas papildināta ar 0,9 % penicilīna un streptomicīna maisījumu un 8,0 % liellopu embriju serumu (FBS).

Izpildes reize: atsevišķs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu. Katra izpildes reize ir pilns eksperiments, ko izdara replikāta iedobēs vienlaikus un ar šūnām no tā paša šūnu krājuma.

Neatkarīga izpildes reize: atsevišķs, neatkarīgs eksperiments, kurā izvērtē ķīmisko iedarbību uz testa bioloģisko iznākumu; izmanto šūnas no dažādiem krājumiem, svaigi atšķaidītas ķimikālijas un testu izdara vai nu dažādās dienās, vai tajā pašā dienā dažādi laboranti.

SN: standartnovirze

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām vielām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (1).

Stabila transfekcija: norise, kuras laikā DNS tiek transficēta kultivētajās šūnās tādā veidā, ka tiek stabili integrēta šūnas genomā, kā rezultātā ir iespējama transficēto gēnu stabila ekspresija. Stabili transficētu šūnu klonus atlasa ar stabiliem marķieriem (piem., pretestība G418).

Tests STTA: stabili transficētas transaktivācijas tests, ERα transkripcionālās aktivācijas tests, izmantojot šūnu līniju HeLa 9 903.

Pētījums: visi eksperimentālā darba posmi, kas izpildīti, lai specifiskā testā izvērtētu vienu atsevišķu, specifisku vielu. Pētījumā ietilpst visi eksperimenta posmi, tostarp testējamās vielas atšķaidīšana testa barotnē, provizoriskie diapazona noteikšanas testi, visi nepieciešamie visaptverošie testi, datu analīze, kvalitātes nodrošināšana, citotoksicitātes novērtēšana utt. Pētījuma pabeigšana ļauj klasificēt, kā testējamā ķimikālija iespaido testā novērtēto toksiskumu (t.i., aktīva, neaktīva, neviennozīmīga), un raksturot atbildreakciju attiecībā pret pozitīvo references ķimikāliju.

Viela: *REACH* regulā [1] viela definēta kā ķīmisks elements un tā dabiski vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, tostarp tās stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušies piejaukumi, kas nav šķīdinātāji, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu. Ļoti līdzīga definīcija tiek izmantota ANO *GHS* (1).

TA (transaktivācija):: mRNS sintēzes iniciēšana kā atbildreakcija uz specifisku ķīmisko signālu, piemēram, estrogēna piesaisti estrogēna receptoram.

---

[1] Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*) un ar kuru izveido Eiropas Ķimikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK (OV L 304, 22.11.2007., 1. lpp.).

▼**M8**

Tests: šīs testēšanas metodes kontekstā tests ir viena no metodikām, kas atzīta par derīgu, proti, kas izpilda norādītos veiktspējas kritērijus. Testa komponenti ir, piemēram, specifiska šūnu līnija un attiecīgie augšanas apstākļi, specifiska barotne, kurā veic testu, plašu sagatavošanas nosacījumi, testējamo ķimikāliju sagatavošana un atšķaidīšana, kā arī visi citi vajadzīgie kvalitātes kontroles pasākumi un saistītie datu izvērtēšanas posmi.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Transkripcija: mRNS sintēze

UVCB: ķīmiskas vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti un bioloģiski materiāli.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

VC (nesēja kontrole): šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamās un kontroles ķimikālijas, testē tikai kā nesēju bez izšķīdinātas ķimikālijas.

VM7: nemirstīga adenokarcinomas šūna, kas endogēniski ekspresē estrogēnu receptorus.

VM7Luc4E2: Šūnu līnija VM7Luc4E2 atvasināta no VM7 nemirstīgām cilvēka adenokarcinomas šūnām, kas spēj endogēniski ekspresēt abas estrogēnu receptoru formas (ERα and ERβ) un ir stabili transficētas ar plazmīdu pGudLuc7.ERE. Plazmīds satur četras kopijas no sintezēta oligonukleotīda, kas satur estrogēna atbildreakcijas elementu virs MMTV promotera un jāņtārpiņa luciferāzes gēnu.

Vāji pozitīvā kontrole: vāji aktīva viela, kas izvēlēta no references ķimikāliju saraksta; to iekļauj visos testos un tā palīdz garantēt testa pienācīgu funkcionēšanu.

▼**M8**

2. papildinājums

STABILI TRANSFICĒTAS CILVĒKA ESTROGĒNU RECEPTORU A TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS, KURĀ NOSAKA ĶIMIKĀLIJU AGONISTU UN ANTAGONISTU ESTROGĒNISKO AKTIVITĀTI, IZMANTOJOT ŠŪNU LĪNIJU HERA-HELA-9903

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā transaktivācijas (TA) testā šūnu līniju hERα-HeLa-9 903 izmanto, lai noteiktu estrogēnisku agonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hERα). Japānas Ķimikāliju izvērtēšanas un izpētes institūta (*CERI*) veiktajā stabili transficētas transaktivācijas (STTA) validācijas pētījumā, kurā šūnu līniju ERα-HeLa-9 903 izmantoja, lai noteiktu estrogēnisku agonista un antagonista aktivitāti, ko mediē cilvēku estrogēnu receptors alfa (hERα), pierādījās, ka tests ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

2. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα-mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Tomēr pie tādām fitoestrogēnu koncentrācijām, kas pārsniedz 1 μM, ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli, ko izraisa luciferāzes reportiergēna pārmērīga aktivācija. Lai gan devas-efekta līkne liecina, ka patiesa ER sistēmas aktivācija notiek pie zemākām koncentrācijām, ir lietderīgi rūpīgi izpētīt tādu luciferāzes ekspresiju stabili transficētās ER TA testu sistēmās (1. papildinājums), ko iegūst pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai tādu savienojumu koncentrācijām, par kuriem ir aizdomas, ka tie līdzīgi kā fitoestrogēni izraisa luciferāzes reportiergēna pārmērīgu aktivāciju.

3. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "**ER TA testa KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 2.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

4. Testu izmanto, lai signalizētu, ka estrogēnu receptors ir piesaistījies ligandam. Pēc liganda piesaistes receptora-liganda komplekss translocējas uz kodolu, kur tas piesaistās specifiskiem DNS reakcijas elementiem un transaktivē jāņtārpiņa luciferāzes reportiergēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta ekspresija šūnās. Luciferīns ir substrāts, kuru luciferāzes enzīms pārveido bioluminiscējošā produktā, ko var kvantitatīvi izmērīt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem.

5. Testa sistēmā izmanto šūnu līniju hERα-HeLa-9 903, kas iegūta no cilvēka dzemdes kakla audzēja un kam ir divi stabili insertēti konstrukti: i) hERαα ekspersijas konstrukts (kura cilvēka receptors iekodēts pilnībā) un ii) jāņtārpiņa luciferāzes reportiergēna konstrukts, kam ir pieci vitelogenīna estrogēna atbildreakcijas elementa (ERE) tandēmie atkārtojumi, ko regulē peļu metalotionīna (MT) promoters ar TATA elementu. Peļu MT TATA gēna konstrukts līdz šim izrādījies visrezultatīvākais, tāpēc tieši to parasti izmanto. Tāpēc šī šūnu līnija hERα-HeLa-9 903 ļauj izmērīt testējamās ķimikālijas spēju inducēt luciferāzes gēna ekspresijas hERα mediētu transaktivāciju.

▼M8

6. ER agonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai testējamās ķimikālijas inducētais maksimālais abildreakcijas līmenis ir vienāds ar vai lielāks par agonista atbildreakciju, kas ir vienāda ar 10 % no atbildreakcijas, ko izraisa koncentrācija, kura inducē pozitīvās kontroles (PC) (17β-estradiols (E2)) maksimālo atbildreakciju (1 nM) (t.i.,. the PK10). ER antagonista testā datu interpretācijas pamatā ir tas, vai atbildreakcija parāda vismaz 30 % aktivitātes samazinājumu salīdzinājumā ar atbildreakciju, ko inducē ar kontroles pastiprinājumu (25 pM, E2), neizraisot citotoksicitāti. Datu analīze un interpretācija sīkāk iztirzāta 34.–48. punktā.

PROCEDŪRA

Šūnu līnijas

7. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju hERα-HeLa-9 903. Šūnu līniju var iegūt no Japānas Pētniecības bioresursu kolekcijas (JCRB) šūnu bankas ([1]), parakstot materiālu nodošanas līgumu.

8. Testēšanā izmanto tikai tādas šūnas, kas nesatur mikoplazmu. Vislabākā un jutīgākā metode, kā noteikt inficēšanos ar mikoplazmu, ir RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (4) (5) (6).

Šūnu līnijas stabilitāte

9. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti, agonista testā par references standartu izmanto E2, 17α-estradiolu, 17α-metiltestosteronu un kortikosteronu; tāpat vismaz vienu reizi testa veikšanas laikā mēra visu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni pie 1. tabulā norādītajām testa koncentrācijām, un iegūtajiem rezultātiem jābūt saskanīgiem ar 1. tabulā norādītajiem rezultātiem.

10. Antagonista testā vienlaikus paralēli katrai testa izpildes reizei mēra arī divu references standartu — tamoksifēna un flutamīda — pilnas koncentrācijas līknes. Pārliecinās, vai abu ķimikāliju kvalitatīvā klasifikācija (pozitīvs vai negatīvs) ir pareiza.

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

11. Šūnas uztur fenolsarkano nesaturošā Īgla minimālajā barotnē (*EMEM*), kas papildināta ar 60 mg/l antibiotiku (kanamicīnu) un 10 % liellopu embriju serumu, kurš apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli (DCC-FBS), CO2 inkubatorā (5 % CO2) 37±1°C temperatūrā. Kad sasniegta 75 -90 % konfluence, šūnas var sadalīt 10 ml subkultūrās, kas satur 0,4 x 105 – 1 x 105 šūnas/ml, kultivēšanas trauciņos, kuru diametrs ir100 mm. Šūnas suspendē 10 % FBS-EMEM barotnē (kas ir līdzvērtīga EMEM un DCC-FBS barotnei) un tad uzsēj mikroplates iedobēs tā, lai blīvums būtu 1 x 104 šūnas/(100 µl x iedobe). Tad pirms eksponēšanas ķimikālijai šūnas 3 stundas preinkubē 5 % CO2 inkubatorā 37°±1°C temperatūrā. Plastmasas materiālos nedrīkst notikt nekāda estrogēniska aktivitāte.

12. Lai saglabātu reakcijas integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma kondicionētā barotnē, un pasāžu skaits nedrīkst pārsniegt 40. Attiecībā uz šūnu līniju hERα-HeLa-9 903 tas būs mazāk par trim mēnešiem. Tomēr, ja šūnas audzē nepienācīgos kultivēšanas apstākļos, šūnu sniegums var pasliktināties.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, fakss: +81-72-641-9812

▼M8

13. DCC-FBS var vai nu sagatavot tā, kā aprakstīts 2.2. papildinājumā, vai iegūt no komerciāliem avotiem.

Pieņemamības kritēriji

Pozitīvi un negatīvi references standarti ER agonistu testā

14. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja,, izmantojot stipru estrogēnu (E2), vāju estrogēnu (17α-estradiolu), ļoti vāju agonistu (17α-metiltestosteronu) un negatīvu vielu (kortikosteronu) piemērotā koncentrācijā. 1. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos 4 paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultātiem jāietilpst dotajās pieņemamajās robežās. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc pieņemamības kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu EC_{50}, PC_{50} un PC_{10} vērtību mainību. Četri paralēlie references standarti, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību, jo pieņemamā diapazonā jābūt gan trīs pozitīvo references standartu PC_{10}, gan PC_{50} un EC_{50} vērtībām, ja tās var aprēķināt (sk. 1. tabulu).

1. tabula.

ER agonista testa četru references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hilla virziena koeficients	Testa diapazons
17β-estradiols (E2) CAS Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradiols CAS 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
Kortikosterons CAS Nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltestosterons CAS Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Pozitīvi un negatīvi references standarti ER antagonistu testā

15. Pirms pētījuma un tā laikā ir jāverificē testa sistēmas reaģētspēja, izmantojot pozitīvu vielu (tamoksifēns) un negatīvu vielu (flutamīds) piemērotā koncentrācijā. 2. tabulā sniegts pieņemamo vērtību diapazons, kas sagatavots validācijas pētījuma (1) gaitā. Šos divus paralēlos references standartus iekļauj katrā eksperimentā, un rezultāti, kā norādīts kritērijos, būtu jānovērtē par pareiziem. Ja tā nav, tad jānoskaidro, kāpēc kritēriji nav izpildīti (iemesli var būt, piem., manipulācijas ar šūnām vai seruma un antibiotiku kvalitāte un koncentrācija), un tests jāatkārto. Bez tam jāaprēķina arī pozitīvās vielas (tamoksifēna) IC_{50} vērtības, un rezultātiem ir jāietilpst dotajās pieņemamības robežās. Ja pieņemamības kritēriji ir izpildīti, tad ļoti svarīga ir šūnu kultivēšanas materiālu konsekventa izmantošana, lai nodrošinātu minimālu IC50 vērtību mainību. Divi paralēlie references standarti, kas jāiekļauj katrā eksperimentā (ko veic identiskos apstākļos, tostarp ar tādiem pašiem materiāliem, šūnu pasāžas līmeni un laborantiem), var nodrošināt testa jutību (sk. 2. tabulu).

▼M8

2. tabula.

ER antagonista testa divu references standartu pieņemamo vērtību diapazons

Nosaukums	Kritēriji	$LogIC_{50}$	Testa diapazons
Tamoksifēns CAS Nr.: 10540-29-1	Pozitīva: jāaprēķina IC50	-5,942 ~ -7,596	10-10 ~ 10-5 M
Flutamīds CAS Nr.: 13311-84-7	Negatīva: nav jāaprēķina IC30	—	10-10 ~ 10-5M

Pozitīvās kontroles un nesēja kontroles

16. ER agonista testa (1 nM, E2) un ER antagonista testa (10μM TAM) pozitīvās kontrole (PC) katrā platē jātestē vismaz trīskārši. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC) katrā platē vismaz trīskārši. Papildus šai VC, ja PC izmanto citu nesēju, nevis testējamo ķimikāliju, šī cita nesēja kontrole ir jātestē vismaz trīskārši tajā pašā platē kopā ar PC.

ER agonista testa kvalitātes kritēriji

17. Pozitīvās kontroles (1 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā (vēsturiski 4 līdz 30 reizes).

18. Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, indukcijas palielinājums, kas atbilst paralēlās pozitīvās kontroles (1 nM, E2) PC10 vērtībai, par 1+2SN pārsniedz paralēlās nesēja kontroles indukcijas vērtību (=1). PC10 vērtības var izrādīties nozīmīgas prioritizēšanas vajadzībām, proti, lai vienkāršotu vajadzīgo datu analīzi salīdzinājumā ar statistisko analīzi. Statistiskā analīze sniedz informāciju par nozīmību, tomēr tā tā nav kvantitatīvs parametrs attiecībā uz koncentrācijas potenciālu, tāpēc tas prioritizēšanā ir mazāk noderīgs.

ER antagonista testa kvalitātes kritēriji

19. Pastiprinātās kontroles (25 nM, E2) vidējai luciferāzes aktivitātei jābūt vismaz 4 reizes lielākai par vidējo VC katrā platē. Šis kritērijs izvēlēts, pamatojoties uz novērtēšanas parametru uzticamību validācijas pētījumā.

20. Kas attiecas uz testa kvalitātes kontroli, 1 nM, E2 relatīvajai transkripcionālai aktivācijai (RTA) jābūt lielākai par 100 %, RTA 1μM 4-hidroksitamoksifēna (OHT) RTA jābūt mazākai par 40,6 % un 100 μM digitonīna (Dig) RTA jābūt mazākai par 0 %.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI").

Nesējs

21. Par paralēlo VC izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) vai piemērotu šķīdinātāju tādā pašā koncentrācijā, kādu izmanto pozitīvajām un negatīvajām kontrolēm un testējamām ķimikālijām. Testa ķimikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķimikālija šķīst un kurš ir sajaucams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 0,1 % (tilp/.tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

▼M8

Testējamo ķimikāliju sagatavošana

22. Parasti testējamās ķimikālijas izšķīdina DMSO vai citā piemērotā šķīdinātājā; iegūto šķīdumu pēc tam vairākkārt atšķaida ar to pašu šķīdinātāju attiecībā 1:10, un iegūto atšķaidījumu izmanto atšķaidīšanai ar barotni.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

23. Ir jāveic sākotnējais tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas diapazonu un noteiktu, vai testējamā ķimikālija varētu uzrādīt kādas šķīdības vai citotoksicitātes problēmas. Sākumā ķimikālijas testē līdz maksimālajai koncentrācijai 1 µl/ml, 1 mg/ml vai 1 mM, atkarībā no tā, kura ir viszemākā. Pamatojoties uz sākotnējā testā novēroto citotoksicitāti vai nešķīdību, pirmajā galīgā testa izpildes reizē ķimikāliju testē sērijveida logaritmiskos atšķaidījumos, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM, 100µM, 10µM utt.), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Koncentrācijas otrajā un, ja vajadzīgs, trešajā izpildes reizē pēc vajadzības pielāgo nolūkā labāk raksturot koncentrācijas-atbildreakcijas līkni un izvairīties no koncentrācijām, pie kurām ķimikālija izrādījusies nešķīstoša vai pārmērīgu citotoksicitāti izraisoša.

24. Kas attiecas uz ER agonistiem un antagonistiem, datus interpretējot, ņem vērā to, ka pieaugošs citotoksicitātes līmenis var mainīt vai izslēgt tipisku sigmoidālu atbildreakciju. Jāizmanto tādas citotoksicitātes testēšanas metodes, kas var sniegt informāciju par 80 % šūnu dzīvotspēju, izmantojot piemērotu, laboratorijā apstiprinātu testu.

25. Ja citotoksicitātes testa rezultāti liecina, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija ir šūnu skaitu samazinājusi par 20 % vai vairāk, šī koncentrācija ir uzskatāma par citotoksisku, un visas koncentrācijas, kas ir vienādas ar vai lielākas par šo robežvērtību, no novērtējuma izslēdz.

Eksponēšana ķimikālijai un izkārtojums testa platē

26. Ķimikāliju atšķaidīšanās (1. un 2. etaps) un šūnu eksponēšanas (3. etaps) procedūra var būt šāda.

1. etaps. Katru testa ķimikāliju seriāli atšķaida DMSO vai piemērotā šķīdinātājā un ievieto mikrotitrēšanas plates iedobēs tā, lai sasniegtu tādas galīgās seriālās koncentrācijas, kādas noteiktas sākotnējā diapazona noteikšanas testā (parasti, piemēram, šādās sērijās: 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) trīskāršai testēšanai.

2. etaps. Ķimikāliju atšķaidīšana: Vispirms 1,5 µl testējamās ķimikālijas atšķaida ar šķīdinātāju, lai iegūtu barotnes tilpumu 500 µl.

3. etaps. Šūnu ķīmiskā ekspozīcija: 50 µl no 2. etapā sagatavotā atšķaidījuma ievieto testa iedobē, kas satur 10^4 šūnas/100 µl/iedobē.

Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 150 µl. Testa paraugu un references standartu sadalījums var būt tāds, kāds redzams 3. un 4. tabulā.

▼**M8**

3. tabula

References standartu koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	17α-metiltestosterons			Kortikosterons			17α-estradiols			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1 % DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

27. References standartus (E2, 17α-estradiols, 17-μετιλτεστοστερονσμυνυκορτικοστερονσκκτεστττκατρ®®ιζπιλδεσιρειζρρρρρταβυλατττKatrā testa platē iekļauj arī iedobes, kas satur PC, kura apstrādāta ar 1 nM no E2 un spēj izraisīt maksimālu E2 inducēšanu, un iedobes, kas satur VC, kura apstrādāta tikai ar DMSO (vai piemērotu šķīdinātāju (4. tabula). Ja vienā eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

4. tabula

Testējamo ķimikāliju un plates kontroles ķimikāliju koncentrāciju sadalījums ER agonista testa platē

Rinda	Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2			Testējamā ķimikālija 3			Testējamā ķimikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼M8

Rinda	Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2			Testējamā ķimikālija 3			Testējamā ķimikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1 % DMSO); PC: pozitīvā kontrole ((1 nM, E2)

5. tabula

References standartu koncentrāciju sadalījums ER antagonista testa platē

Rinda	Tamoksifēns			Flutamīds			Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	konc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2), OHT :4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns.

= pastiprināts ar 25pM, E2

28. Lai novērtētu ķimikāliju antagonistisko aktivitāti, iedobēs, kas atrodas A līdz G rindā, pievieno 25pM, E2. References standartus (tamoksifēns un flutamīds) testē katrā izpildes reizē. Katrā testa platē iekļauj arī iedobes ar PC, kas apstrādātas ar 1 nM, E2 un ko var izmantot par šūnu līnijas hERα-HeLa-9 903 kvalitātes kontroli, iedobes ar VC, kas apstrādātas ar DMSO (vai piemērotu šķīdinātāju), iedobes ar 0,1 % DMSO, kas apstrādātas ar DMSO, kurš pievienots E2 pastiprinātajai koncentrācijai, kas atbilst "pastiprinātajai kontrolei", iedobes ar 1 μM OHT galīgajā koncentrācijā un iedobes ar 100 μM Dig (5. tabula). Pārējās testa platēs izkārtojums ir tāds pats, taču netiek iekļautas references standartu iedobes (6. tabula). Ja vienā eksperimentā izmanto šūnas no dažādiem avotiem (piem., atšķirīgs pasāžu skaits vai atšķirīgas partijas utt.), tad references standartus testē ar katru šūnu avotu.

▼M8

6. tabula

Testējamo ķimikāliju un plates kontroles ķimikāliju koncentrāciju sadalījums ER antagonista testa platē

Rinda	Testējamā ķimikālija 1			Testējamā ķimikālija 2			Testējamā ķimikālija 3			Testējamā ķimikālija 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1% DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: nesēja kontrole (0,1% DMSO); PC: pozitīvā kontrole (1 nM, E2); OHT: 4-hidroksitamoksifēns, Dig: digitonīns

: pastiprināts ar 25pM, E2

29. Pienācīgi jāpārliecinās, ka nav nekādu malas efektu; ja ir aizdomas, ka malas efekti varētu rasties, izkārtojums platē ir jāmaina, lai tos novērstu, piemēram, malās esošās iedobes var atstāt tukšas.

30. Pēc ķimikāliju pievienošanas testa plates 20-24 h inkubē 5 % CO2 inkubatorā 37±1°C temperatūrā, lai inducētu reportiergēnu produktu veidošanos.

31. Īpaša uzmanība jāpievērš sevišķi gaistošiem savienojumiem. Tādos gadījumos tuvumā esošās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus, un tie būtu jāsalīdzina ar gaidītajām un vēsturiskajām kontrolvērtībām. Nedaudzajos gadījumos, kad gaistamība var izrādīties problemātiska, ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.

32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, galīgos testus ar to pašu ķimikāliju atkārto dažādās dienās.

Luciferāzes tests

33. Šajā testā var izmantot tirdzniecībā pieejamus luciferāzes testa reaģentus [piem., luciferāzes testa sistēmu Steady-Glo® (Promega, E2510 vai līdzvērtīgs)] vai standarta luciferāzes testa sistēmu (Promega, E1500 vai līdzvērtīgs), ar nosacījumu, ka tiek izpildīti pieņemamības kritēriji. Testa reaģentus izvēlās atkarībā no izmantojamā luminometra jutības. Ja izmanto standarta luciferāzes testa sistēmu, pirms substrāta pievienošanas izmanto šūnu kultūras līzes reaģentu (piem., Promega, E1531 vai līdzvērtīgs). Luciferāzes reaģentu lieto saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

DATU ANALĪZE

ER agonista tests

34. ER agonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC (1 nM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

▼M8

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina normalizētās PC vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās PC vidējo vērtību (PC=100 %).

Attiecībā uz karu iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar PC atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību. Iegūtais rezultāts liecina par vidējo transkripcionālo aktivitāti (atbildreakcija) un par to, pie kādas koncentrācijas šī atbildreakcija tiek inducēta (sk. nākamo sadaļu).

EC_{50}, PC_{50} un PC_{10} inducēšanas noteikšana

35. Lai aprēķinātu EC50, ir vajadzīga pilnīga koncentrācijas-atbildreakcijas līkne, tomēr tas ne vienmēr ir iespējami vai lietderīgi, jo var pastāvēt zināmi koncentrācijas diapazona ierobežojumi (piemēram, citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ). Tomēr, tā kā EC50 un maksimālais inducēšanas līmenis (kas atbilst Hilla vienādojuma maksimālajai vērtībai) ir informatīvi parametri, tie parametri pēc iespējas būtu jānorāda. EC50 un maksimālā inducēšanas līmeņa aprēķinā jāizmanto piemērota statistiskā programmatūra (piem., *Graphpad Prism*).Ja datiem par koncentrāciju un atbildreakciju ir piemērojams Hilla logistiskais vienādojums, EC50 aprēķina ar šādu vienādojumu(7):

Y= bāzes punkts+ (virsotnes punkts- bāzes punkts) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hilla virziena koeficients)) kur:

X ir koncentrācijas logaritms; un

Y ir reakcija; to mēra no sigmoidālās līknes bāzes līdz virsotnei. Hilla logistiskajā vienādojumā bāzes punkts ir nulle.

36. Par katru testējamo ķimikāliju sniedz šādus datus:

RPCMax , kas ir testa ķimikālijas inducētās atbildreakcijas maksimālais līmenis un ko izsaka procentos no 1 nM, E2 inducētās atbildreakcijas rajā pašā platē, kā arī PC_{Max} (koncentrācija, kas atbilst RPCMax); un

ja ķimikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē PC10 un attiecīgā gadījumā PC50.

37. PCx vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem PCx vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem PCx vērtības, ir koordinātas attiecīgi (a,b) un (c,d), tad PCx vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

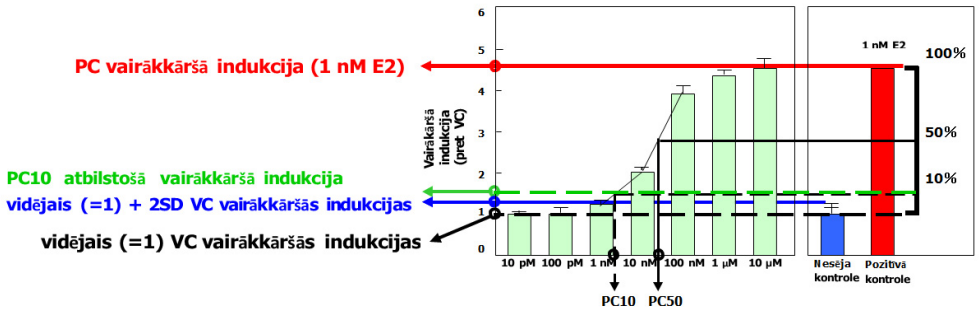
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. PC vērtību apraksts sniegts 1. attēlā.

1. attēls

PC vērtību atvasināšanas piemērs. PC (1 nM, E2) ir katrā testa platē



ER antagonista tests

39. ER antagonista testa gadījumā relatīvo transkripcionālo aktivitāti (RTA) attiecībā pret pastiprināto kontroli (25 pM, E2) iegūst, analizējot luminiscences signālus tajā pašā platē šādos etapos (ir pieņemamas arī līdzvērtīgas matemātiskās darbības):

1. etaps. Aprēķina VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi. 3. etaps. Aprēķina normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību.

4. etaps. Plates katras iedobes normalizēto vērtību dala ar normalizētās pastiprinātās kontroles vidējo vērtību (pastiprinātā kontrole=100 %).

Attiecībā uz karu iedobi iegūtā vērtība atbilst šīs iedobes transkripcionālajai aktivitātei salīdzinājumā ar pastiprinātās kontroles atbildreakciju.

5. etaps. Aprēķina katras koncentrāciju grupas relatīvās transkripcionālās aktivitātes vidējo vērtību.

IC_{30} and IC_{50} inducēšanas noteikšana

40. Ja ķimikālijas ir pozitīvas — koncentrācijas, kas inducē IC30 un attiecīgā gadījumā IC50.

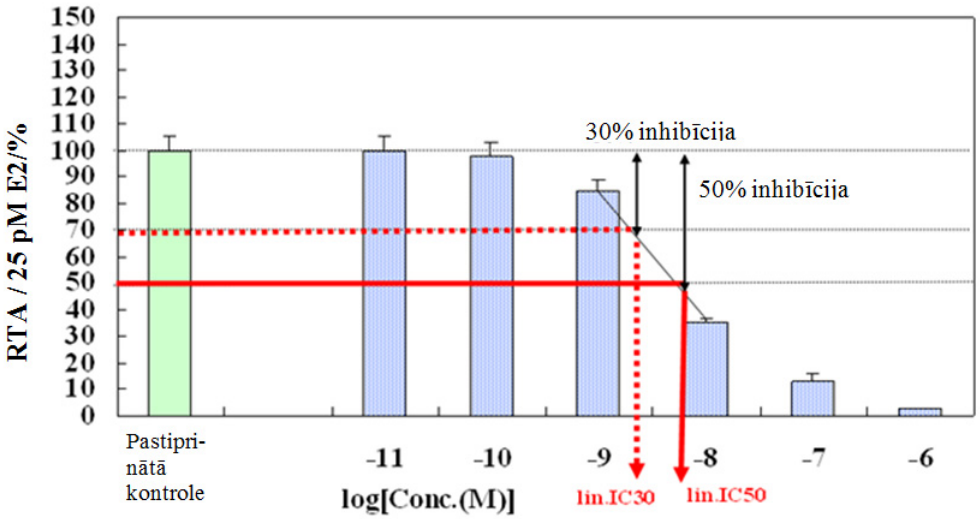
41. ICx vērtību var aprēķināt, interpolējot starp 2 punktiem uz X-Y līknes, no kuriem viens atrodas uzreiz virs, bet otrs uzreiz zem ICx vērtības. Ja datu punktiem, kas atrodas uzreiz virs un uzreiz zem ICx vērtības, ir koordinātas attiecīgi (c,d) un (a,b), tad ICx vērtību var aprēķināt ar šādu vienādojumu:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

2. attēls

IC vērtību atvasināšanas piemērs. Pastiprinātā kontrole (25 pM, E2) ir katrā testa platē



RTA: relatīvā transkripcionālā aktivitāte

42. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

— atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. sadaļu "Pieņemamības kritēriji", 14.-20. punkts),

— ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

7. tabula

Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER agonistu testā

Pozitīvs	Ja ir iegūta tāda RPC_{Max} vērtība, kas ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja RPC_{Max} vērtība nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

8. tabula

Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ER antagonistu testā

Pozitīvs	Ja IC30 ir aprēķināta vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.
Negatīvs	Ja IC30 nav aprēķināta divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

▼**M8**

43. Datu interpretācijas kritēriji ir redzami 7. un 8. tabulā. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme Šo divējādo mērķi iespējams sasniegt, ja rezultātus izsaka kā koncentrāciju, pie kuras agonista testā sasniedz 50 % (PC50) vai 10 % (PC10) no PC vērtībām un antagonista testā 50 % (IC50) vai 30 % (IC30) no pastiprinātās kontroles vērtībām tiek inhibētas. Testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu, ka testējamās ķimikālijas inducētā maksimālā atbildreakcija (RPCMax) ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no PC atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm, un par negatīvu, ja RPCMax nesasniedz vismaz 10 % no pozitīvās kontroles atbildreakcijas vismaz divās no divām vai divās no trijām izpildes reizēm.

44. PC10, PC50 un PCMax ER agonista testā un IC30 un IC50 ER antagonista testā var aprēķināt, izmantojot izklājlapu, kas pieejama kopā ar šīm testēšanas vadlīnijām ESAO publiskajā vietnē ([1]).

45. PC10 vai PC50 un IC30 vai IC50 vērtību noteikšanai ir pietiekami testu atkārtot divreiz. Tomēr, ja datu bāzlīnija tajā pašā koncentrāciju diapazonā uzrāda pārlieku augstu variācijas koeficientu (VK, %), šos datus nevar uzskatīt par ticamiem un ir jānoskaidro šādu variāciju iemesls. To triplicēto jēldatu (t.i., luminiscences intensitātes datu) variācijas koeficientam, kurus izmanto kā datu punktus PC10 aprēķinā, ir jābūt mazākam par 20 %.

46. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplicēšana.

47. ER agonista testa gadījumā, kur ir nepieciešama plašāka informācija papildus tai, kas vajadzīga šajās vadlīnijās paredzētajam skrīningam un prioritizēšanai attiecībā uz pozitīvām testējamām ķimikālijām, jo īpaši PC10-PC49 ķimikālijām, kā arī ķimikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu pārlieku stimulēt luciferāzi, apstiprinājumu tam, ka novērotā luciferāzes aktivitāte ir tikai ERα specifiska atbildreakcija, var gūt, izmantojot ERα antagonistu (sk. 2.1. papildinājumu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

48. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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 (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([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., 78(1), 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., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol*., 235, E97-El02.

▼M8

2.1. papildinājums

PSEIDOPOZITĪVI REZULTĀTI: NOVĒRTĒJUMS PAR RECEPTORU NEMEDIĒTIEM LUMINISCENCES SIGNĀLIEM

1. ER agonista testā pseidopozitīvus rezultātus var dot vai nu ER nemediēta luciferāzes gēna aktivācija, vai gēna produkta tieša aktivācija, vai nesaistīta fluorescence. Par šādu efektu liecina nepilnīga vai neparasta devas-atbildreakcijas līkne. Ja rodas šādas aizdomas, izvērtē, kāda ietekme uz atbildreakciju ir ER antagonistam (piem., 4-hidroksitamoksifēnam (OHT)) netoksiskās koncentrācijās. Šim nolūkam var nebūt derīgs tīrais antagonists ICI 182780 , jo pienācīga ICI 182780 koncentrācija var samazināt VK vērtību, bet tas savukārt ietekmē datu analīzi.

1. Lai garantētu šādas pieejas derīgumu, tajā pašā platē jātestē šādi elementi:

   — nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāte ar OHT (10 μM) un bez tā;

   — VK (trīsreiz)

   — OHT (trīsreiz)

   — 1 nM, E2 (trīsreiz) kā agonista PC

   — 1 nM, E2 + OHT (trīsreiz)

Datu interpretācijas kritēriji

Piezīme. Visās iedobēs nesējs ir tādā pašā koncentrācijā.

— Ja nezināmās ķimikālijas agonistisko aktivitāti NEIETEKMĒ apstrāde ar ER antagonistu, rezultātu uzskata par "negatīvu".

— Ja nezināmās ķimikālijas agonistiskā aktivitāti ir pilnībā inhibēta, piemēro interpretācijas kritērijus.

— Ja agonistiskā aktivitāte pie zemākās koncentrācijas ir vienāda a vai lielāka par PC10 , nezināmās ķimikālijas atbildreakcija ir inhibēta tādā pašā vai lielākā mērā kā PC10 atbildreakcija. Aprēķina starpību starp atbildreakcijām ar ER antagonistu apstrādātās un neapstrādātās iedobēs; šo starpību uzskata par patieso atbildreakciju un izmanto, lai aprēķinātu parametrus, kas nepieciešami ķimikālijas klasificēšanai.

Datu analīze

Pārbauda veiktspējas standartu.

Pārbauda VK starp iedobēm, kas apstrādātas vienādos apstākļos.

1. Aprēķina VK vidējo vērtību.

2. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar **OHT** neapstrādātās iedobes vērtības.

3. Aprēķina OHT vidējo vērtību.

4. Šo VK vidējo vērtību atskaita no katras ar OHT apstrādātās iedobes vērtības.

5. Aprēķina PC vidējo vērtību.

6. Aprēķina visu pārējo iedobju relatīvo transkripcionālo aktivitāti attiecībā pret PC.

▼M8

2.2. papildinājums

AR DCC (AR DEKSTRĀNU PĀRKLĀTA OGLE) APSTRĀDĀTA SERUMA SAGATAVOŠANA

1. Seruma apstrādāšana ar DCC (ar dekstrānu pārklāta ogle) plaši izmantots paņēmiens, kā no seruma atdalīt šūnu barotnei pievienotos estrogēniskos savienojumus, lai izslēgtu, ka atbildreakcija ir nobīdījusies, jo serumā ir estrogēnu atliekas. Ar šo paņēmienu var apstrādāt 500 ml liellopu embriju seruma.

Sastāvdaļas

2. Nepieciešamie materiāli un aprīkojums

Materiāli

Aktīvā ogle

Dekstrāns

Magnija hlorīda heksahidrāts (MgCl2 6H2O)

Saharoze

1 M HEPES buferšķīdums (pH 7,4)

Filtrācijas ceļā iegūts ultratīrs ūdens

Aprīkojums

Autoklāvēts stikla trauks (izmēru attiecīgi pielāgo) Parastā laboratorijas centrifūga (temperatūru iespējams iestatīt uz 4 °C)

PROCEDŪRA

2. Šī procedūra domāta centrifūgas mēģenēm ar tilpumu 50 ml.

[1. diena] Ar dekstrānu pārklāto ogli suspendē 1 l ultratīrā ūdens, kam pievienots 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M saharozes, 2,5 g ogles, 0,25 g dekstrāna un 5 mM HEPES; maisa 4 °C visu nakti.

[2. diena] Suspensiju salej 50 ml centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā. Atdala supernatantu, un pusi no ogles nogulsnēm atliek 4 °C temperatūrā izmantošanai 3. dienā. Atlikušu pusi suspendē FBS, kas ir lēni atkausēts (lai nepieļautu izgulsnēšanos) un pēc tam 30 minūtes 56 °C temperatūrā inaktivēts; pārlej autoklāvētā stikla traukā (piem., Erlenmeijera kolbā). Šo suspensiju atstāj uz nakti un lēni maisa 4 °C temperatūrā.

[3. diena] FBS suspensiju salej centrifūgas mēģenēs un 10 minūtes centrifugē ar 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā. Savāc FBS un pārlej to 2. dienā sagatavotajās un atliktajās ogles nogulsnēs. Šīs ogles nogulsnes suspendē FBS un uz nakti lēni maisa 4 °C temperatūrā.

[4. diena] Šo suspensiju salej mēģenēs, 10 min. centrifugē pie 10 000 apgr./min. 4 °C temperatūrā; supernatantu sterilizē, filtrējot caur 0,2 μm sterilu filtru. Šo ar DCC apstrādāto FBS glabā -20 °C temperatūrā, un tas ir jāizmanto gada laikā.

▼**M8**

3. Papildinājums

VM7LUC ESTROGĒNA RECEPTORU TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS ESTROGĒNA RECEPTORU AGONISTU UN ANTAGONISTU NOTEIKŠANAI

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šajā testā izmanto VM7Luc4E2 šūnu līniju ([1]). To ir apstiprinājis Alternatīvu toksikoloģisko metožu novērtēšanas nacionālās toksikoloģijas programmas starpaģentūru centrs (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) un Alternatīvo metožu validēšanas starpaģentūru koordinācijas komiteja (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). VM7Luc šūnu līnijas galvenokārt ekspresē endogēniskos ERα un nelielu daudzumu endogēnisko ERβ (2) (3) (4).

2. Šis tests ir izmantojams ļoti daudzām vielām, ja vien tās šķīst dimetilsulfoksīdā (DMSO; CAS Nr. 67-68-5), nereaģē ar DMSO vai šūnu kultūru un testējamajā koncentrācijā nav citotoksiskas. Ja DMSO izmantošana nav iespējama, var izmantot citu nesēju, piem., etanolu vai ūdeni (sk. 12. punktu). Pierādītā VM7Luc ER TA (ant)agonistu testa veiktspēja liecina, ka ar šo testu iegūtie dati var sniegt informāciju par ER mediētiem darbības mehānismiem, un tos var izmantot, nosakot, kuras vielas testējamas prioritāri.

3. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα un hERß mediētas TA noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot hemiluminiscenci. Hemiluminiscence tiek plaši izmantota biotestos, jo luminiscencei ir augsta signāla un fona attiecība. Tomēr vielas, kas inhibē luciferāzes fermentu, var radīt maldīgu priekšstatu par jāņtārpiņu luciferāzes aktivitāti šūnu testos, proteīnu stabilizācijas dēļ izraisot šķietamu inhibīciju vai pastiprinātu luminiscenci. Turklāt dažos uz luciferāzi balstītos ER reportiergēnu testos ir novēroti receptoru nemediēti luminiscences signāli luciferāzes reportiergēna pārmērīgas aktivācijas dēļ, ja fitoestrogēnu koncentrācija ir lielāka par 1 μM (9) (11). Lai gan devas–atbildreakcijas līkne liecina, ka ER sistēmas patiesā aktivācija rodas pie mazākām koncentrācijām, stabili transficētu ER TA testu sistēmās rūpīgi jāpārbauda luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie fitoestrogēnu vai tādu līdzīgu savienojumu, par kuriem ir aizdomas, ka tie rada fitoestrogēniem līdzīgu pārmērīgu luciferāzes reportiergēna aktivāciju, augstām koncentrācijām.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa "VISPĀRĪGAIS IEVADS" un "ER TA TESTA KOMPONENTI". Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

([1]) Līdz 2016. gada jūnijam šo šūnu līniju sauca par BG1Luc šūnu līniju. BG-1 šūnas pirmoreiz aprakstīja Geisinger et al. (1998) (12), un pēc tam tās sīkāk raksturoja Nacionālā Vides veselības zinātņu institūta (NIEHS) pētnieki (13). Salīdzinoši nesen atklāts, ka pētnieki izmanto divus dažādus BG-1 šūnu variantus — BG-1 Fr un BG-1 NIEHS. Li un līdzstrādnieku veiktā padziļinātā analīzē (2014) (14) atklājās, ka BG-1 Fr ir unikāla un ka BG-1 NIEHS, t.i., sākotnējā šūnu līnija, ko izmantoja testa izstrādē, nav vis BG1 cilvēka olnīcu karcinomas šūnu līnija, bet gan MCF7 cilvēka krūts vēža šūnu līnijas variants. Testā izmantoto šūnu līniju, ko sākotnēji sauca par BG1Luc4E2 (15), tagad apzīmēs kā VM7Luc4E2 ("V" = variants; "M7" = MCF7 šūnas). Tāpat testu tagad apzīmēs kā VM7Luc ER TA. Lai gan mainās testa pamatā esošās šūnu līnijas izcelsme, tas neietekmē ne publicētos validācijas pētījumus, ne šā testa izmantošanas lietderību estrogēnisko/antiestrogēnisko ķimikāliju skrīningā.

▼M8

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Testu izmanto, lai norādītu ER ligandu saistīšanos, kam seko receptoru–ligandu kompleksa translokācija uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saistās ar specifiskiem DNS atbildreakcijas elementiem un transaktivē reportiergēnu (luc), kā rezultātā veidojas luciferāze un pēc tam izstarojas gaisma, kuru var kvantitatīvi noteikt ar luminometru. Luciferāzes aktivitāti var ātri un lēti izvērtēt ar vairākiem komerciāli pieejamiem testa komplektiem. VM7Luc ER TA testā izmanto uz ER reaģējošu cilvēka krūts adenokarcinomas šūnu līniju VM7, kas ir stabili transficēta ar jāņtārpiņu *luc* reportiera konstruktu, ko regulē četri estrogēnu atbildreakcijas elementi, kas ievietoti pirms peles krūts audzēja vīrusa promotera (MMTV), lai noteiktu vielas, kas *in vitro* uzrāda ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. Šim MMTV promoteram vērojama tikai neliela krusteniskā reakcija ar citiem steroīdajiem un nesteroīdajiem hormoniem (8). Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 41. punktā. Īsumā, pozitīvu atbildreakciju raksturo tāda koncentrācijas–atbildreakcijas līkne, kurā ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas (vidējā vērtība ± standartnovirze) nepārklājas, kā arī tādas amplitūdas izmaiņas (normalizētā relatīvā gaismas vienība (RLU)), kas ir vismaz 20 % no references standarta maksimālās vērtības(17β-estradiols [E2; CAS Nr. 50-28-2] agonistu testam, raloksifena HCl [Ral; CAS Nr. 84449-90-1]/E2 antagonistu testam).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

6. Testam izmanto stabili transficēto šūnu līniju VM7Luc4E2. Pašlaik šūnu līnija iegādājama tikai ar tehniskās licences līgumu no Kalifornijas universitātes Deivisā (University of California, Davis), Kalifornijā, ASV ([1]), un no Xenobiotic Detection Systems Inc. Daremā, Ziemeļkarolīnā, ASV ([2]).

Šūnu līnijas stabilitāte

7. Lai saglabātu šūnu līnijas stabilitāti un integritāti, šūnas audzē vairākās pasāžās no sasaldēta krājuma šūnu uzturēšanas barotnē (sk. 9. punktu). Šūnas nedrīkst kultivēt vairāk nekā 30 pasāžās. VM7Luc4E2 šūnu līnijai 30 pasāžas nozīmē apmēram trīs mēnešus.

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

8. Jāievēro Norādījumos par labu šūnu kultivēšanas praksi (Guidance on Good Cell Culture Practice) (5) (6) norādītās procedūras, lai nodrošinātu visu materiālu un metožu kvalitāti un garantētu visa veiktā darba integritāti, derīgumu un reproducējamību.

9. VM7Luc4E2 šūnas tur RPMI 1 640 barotnē, kam pievienots 0,9 % penicilīna–streptomicīna maisījums (Pen-Strep) un 8,0 % liellopu embriju serums (FBS), īpašā audu kultivēšanas inkubatorā 37 °C ± 1 °C temperatūrā, 90 % ± 5 % mitrumā un 5,0 % ± 1 % CO_2/gaisā.

10. Kad sasniegta ~80 % konfluence, VM7Luc4E2 šūnas 48 stundas subkultivē un kondicionē bezestrogēna vidē pirms šūnu uzsēšanas 96 iedobju platēs, lai eksponētu testējamām ķimikālijām un analizētu no estrogēna atkarīgo luciferāzes aktivitātes inducēšanu. Bezestrogēna barotne (EFM) satur Dulbeko

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, email: info@dioxins.com, Telephone: 919-688-4804, fakss: 919-688-4404

▼M8

modificēto Īgla barotni (DMEM) bez fenolsarkanā, kas papildināta ar 4,5 % ar ogli/dekstrānu apstrādātu FBS, 1,9 % L-glutamīnu un 0,9 % Pen-Strep. Nevienam plastmasas izstrādājumam nedrīkst būt estrogēniskas aktivitātes [sk. detalizēto protokolu (7)].

Pieņemamības kritēriji

11. Testa apstiprināšanas vai noraidīšanas pamatā ir novērtējums par rezultātiem, kas katrā 96 iedobju platē iegūti ar references standartiem un kontroli. Katru references standartu testē vairākās koncentrācijās, un ir vairāki katras references standarta un kontroles koncentrācijas paraugi. Rezultātus salīdzina ar kvalitātes kontrolēm (KK) šiem parametriem, kas iegūti no agonistu un antagonistu vēsturiskajām datubāzēm, ko katra laboratorija izveidojusi kompetences pierādīšanas laikā. Vēsturiskajās datubāzēs pastāvīgi tiek atjauninātas references standartu un kontroles vērtības. Ja mainās aprīkojums vai laboratorijas apstākļi, var būt nepieciešams izveidot atjauninātas vēsturiskās datubāzes.

Agonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Inducēšana: nosaka inducēšanu platē, , vidējo augstāko E2 references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu indukciju, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja indukcija ir vismaz četrkārša vai lielāka.

- DMSO kontroles rezultāti: šķīdinātāja kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

- Eksperiments, kas neatbilst kādam no pieņemamības kritērijiem, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no agonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

- References standarta rezultāti. E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.

- Pozitīvās kontroles rezultāti. Metoksihlora kontroles RLU vērtībām jābūt lielākām par DMSO vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi no DMSO vidējās vērtības.

- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Antagonistu tests

Diapazona noteikšanas tests

- Samazinājums Samazinājumu platē nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību. Parasti iegūst pieckāršu samazinājumu, taču eksperimentu uzskata par pieņemamu, ja samazinājums ir vismaz trīskāršs.

- E2 kontroles rezultāti. E2 kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās E2 kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

▼M8

- DMSO kontroles rezultāti: DMSO kontroles RLU vērtībām jābūt ne vairāk kā 2,5 reizes lielākām par vēsturiskās šķīdinātāja kontroles vidējās RLU vērtības standartnovirzi.

- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

Visaptverošs tests

Te ietilpst pieņemamības kritēriji no antagonistu diapazona noteikšanas testa un tālāk norādītie kritēriji.

- References standarta rezultāti. Ral/E2 references standarta koncentrācijas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai un ar vismaz trim vērtībām koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā.

- Pozitīvās kontroles rezultāti. Tamoksifēna/E2 kontroles RLU vērtībām jābūt mazākām par E2 kontroles vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi no E2 kontroles vidējās vērtības.

- Eksperiments, kas neatbilst pat vienam pieņemamības kritērijam, jāatmet un jāatkārto.

References standarti, pozitīvās un nesēja kontroles

Nesēja kontrole (agonistu un antagonistu testi)

12. Nesēju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā nesēja kontroli (VC). VM7Luc ER TA testa validēšanā izmantotais nesējs bija 1 % (tilpumkoncentrācija) dimetilsulfoksīds (DMSO, CAS Nr. 67-68-5) (sk. 24. punktu). Ja izmanto citu nesēju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas vajadzības gadījumā jātestē tajā pašā nesējā.

References standarts (agonistu diapazona noteikšana)

13. References standarts ir E2 (CAS Nr. 50-28-2). Diapazona noteikšanas testēšanā references standarts nozīmē, ka četras E2 koncentrācijas ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ un $2{,}87 \times 10^{-12}$ M) sērijveidā atšķaida, katru koncentrāciju testējot dubultiedobēs.

References standarts (agonistu visaptverošs tests)

14. Visaptverošā testēšanā E2 sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2, līdz iegūst 11 E2 koncentrācijas (diapazonā no $3{,}67 \times 10^{-10}$ līdz $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu diapazona noteikšana)

15. References standarts ir Ral (CAS Nr. 84449-90-1) un E2 (CAS Nr. 50-28-2) maisījums. Diapazona noteikšanas testēšanā Ral/E2 maisījumu sērijveidā atšķaida, līdz iegūst trīs Ral koncentrācijas ($3{,}06 \times 10^{-9}$; $7{,}67 \times 10^{-10}$ un $1{,}92 \times 10^{-10}$M) ar E2 konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) dubultiedobēs.

References standarts (antagonistu visaptverošs tests)

16. Visaptverošā testēšanā Ral (diapazonā no $2{,}45 \times 10^{-8}$ līdz $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) sērijveidā atšķaida attiecībā 1:2 ar E2 konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M), līdz iegūst deviņas Ral/E2 koncentrācijas dubultiedobēs.

Vāji pozitīvā kontrole (agonisti)

17. Vāji pozitīvā kontrole ir $9{,}06 \times 10^{-6}$ M p,p'-metoksihlors (metoksihlors; CAS Nr. 72-43-5) EFM barotnē.

▼M8

Vāji pozitīvā kontrole (antagonisti)

18. Vāji pozitīvā kontrole ir tamoksifēns (CAS Nr. 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M ar E2 9,18 × 10^{-11} M EFM barotnē.

E2 kontrole (tikai antagonistu tests)

19. E2 kontrole ir E2 9,18 × 10^{-11} MEFM barotnē, un to izmanto kā bāzlīnijas negatīvo kontroli.

Vairākkāršā indukcija (agonisti)

20. References standarta (E2) luciferāzes aktivitātes indukciju nosaka, vidējo augstāko E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, un rezultātam jābūt vairāk nekā četras reizes lielākam.

Vairākkāršais samazinājums (antagonisti)

21. References standarta (Ral/E2) luciferāzes aktivitātes vidējo vērtību nosaka, vidējo augstāko Ral/E2 references standarta RLU vērtību dalot ar vidējo DMSO kontroles RLU vērtību, tai jābūt vairāk nekā trīs reizes lielākai.

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

22. Testa ķimikālijas izšķīdina tādā šķīdinātājā, kurā attiecīgā testējamā ķimikālija šķīst un kurš ir sajaucams ar šūnu barotni. Piemēroti nesēji ir ūdens, etanols (tīrība 95 -100 %) un DMSO. Ja izmanto DMSO, tā saturs nedrīkst pārsniegt 1 % (tilp/.tilp.). Par katru nesēju ir jāpierāda, ka maksimālais izmantotais tilpums nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu. References standartus un kontroles izšķīdina 100 % šķīdinātājā un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām.

Testējamo ķimikāliju sagatavošana

23. Testējamās ķimikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā) un pēc tam EFM barotnē atšķaida līdz atbilstīgām koncentrācijām. Pirms izšķīdināšanas un atšķaidīšanas jānogaida, līdz visas testējamās ķimikālijas sasilst līdz istabas temperatūrai. Katram eksperimentam jāsagatavo svaigi testējamo ķimikāliju šķīdumi. Šķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā, taču galīgais references standarts, kontroles atšķaidījumi un testējamās ķimikālijas katram eksperimentam jāsagatavo svaigas un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība un citotoksicitāte Apsvērumi par diapazona noteikšanu

24. Diapazona noteikšanas pamatā ir septiņi sērijveida atšķaidījumi attiecībā 1:10 divos atkārtojumos. Sākumā testējamās ķimikālijas testē pie maksimālās koncentrācijas 1 mg/ml (~1 mM) agonistu testēšanā un 20 µg/ml (~10 µM) antagonistu testēšanā. Diapazona noteikšanas eksperimentus izmanto, lai noteiktu:

— testējamās ķimikālijas sākuma koncentrācijas, kas izmantojamas visaptverošā testēšanā;

— testējamās ķimikālijas atšķaidījumus (1:2 vai 1:5), kas izmantojami visaptverošā testēšanā.

▼M8

25. Šūnu dzīvotspējas/citotoksicitātes novērtējums ir ietverts agonistu un antagonistu testu protokolos (7) un iekļauts diapazona noteikšanas un visaptverošajā testēšanā. Citotoksicitātes metode, ko izmantoja šūnu dzīvotspējas novērtēšanai VM7Luc ER TA testa (1) validēšanas laikā, bija mērogota kvalitatīvā vizuālās novērošanas metode, tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot kvantitatīvu metodi (skatīt protokolu (7)). Nevar izmantot datus par testējamās ķimikālijas koncentrācijām, kas izraisa dzīvotspējas samazināšanos par vairāk nekā 20 %.

Eksponēšana ķimikālijai un izkārtojums testa platē

26. Šūnas saskaita un uzsēj audu kultūras 96 iedobju platēs (2 x 10^5 šūnas vienā iedobē) EFM barotnē, un inkubē 24 stundas, lai šūnas varētu piestiprināties pie plates. EFM atdala un aizstāj ar testējamajām un references ķimikālijām EFM barotnē, un inkubē 19–24 stundas. Īpaša uzmanība jāpievērš ļoti gaistošām vielām, jo tuvējās kontroliedobes var dot pseidopozitīvus rezultātus. Šādos gadījumos ieteicams izmantot iedobju aizlīmes, kas ļauj testēšanas laikā efektīvi izolēt atsevišķas iedobes.

Diapazona noteikšanas tests

27. Diapazona noteikšanas testēšanā izmanto visas 96 iedobju plates iedobes; testē līdz pat sešām testējamajām ķimikālijām septiņās dažādās koncentrācijās, ko iegūst sērijveida atšķaidīšanā attiecībā 1:10 divos atkārtojumos (sk. 1. un 2. attēlu).

— *Agonistu* diapazona noteikšanas testēšanā izmanto četras E2 koncentrācijas divos atkārtojumos kā references standartu un četras DMSO kontroles replikāta iedobes.

— Antagonistu diapazona noteikšanas testēšanā izmanto trīs Ral/E2 maisījuma koncentrācijas (E2 ir konstants 9,18 × 10^{-11} M) divos atkārtojumos kā references standartu un trīs replikātu iedobes, kas paredzētas E2 un DMSO kontrolēm.

1. attēls.

Agonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: no E2-1 līdz E2-4 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

▼M8

2. attēls.

Antagonistu diapazona noteikšanas testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-3 = raloksifena/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC1-1 līdz TC1-7 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-7 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC3-1 līdz TC3-7 = 3. testējamās ķimikālijas (TC3) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC4-1 līdz TC4-7 = 4. testējamās ķimikālijas (TC4) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC5-1 līdz TC5-7 = 5. testējamās ķimikālijas (TC5) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC6-1 līdz TC6-7 = 6. testējamās ķimikālijas (TC6) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).

Piezīme. Visas testējamās ķimikālijas testē E2 klātbūtnē ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M).

28. Ieteicamais galīgais barotnes tilpums katrā iedobē ir 200 µl. Izmanto tikai tādas testa plates, kurās šūnām visās iedobēs dzīvotspēja ir 80 % un lielāka.

29. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai ***agonistu*** testēšanai ir detalizēti aprakstīta agonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav lielāks par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir lielāki par DMSO kontroles rezultātu vidējo vērtību plus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt par vienu logaritmu augstākai nekā koncentrācijai, kas diapazona noteikšanā dod augstāko koriģēto RLU vērtību. 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā izmanto atšķaidījumu attiecībā 1:5.

▼M8

— Ja diapazona noteikšanas testā testējamā ķimikālija uzrāda vielai divfāzu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, arī visaptverošajā testēšanā ir jāapskata abas fāzes.

30. Sākuma koncentrāciju noteikšana visaptverošai antagonistu testēšanai ir detalizēti aprakstīta antagonistu protokolā (7). Īsumā, tiek izmantoti tālāk aprakstītie kritēriji.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē neviens punkts nav mazāks par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošai testēšanai izmanto 11 punktu atšķaidījumu sēriju attiecībā 1:2, sākot ar maksimālo šķīstošo koncentrāciju.

— Ja testējamās ķimikālijas koncentrācijas līknē ir punkti, kas ir mazāki par E2 kontroles rezultātu vidējo vērtību mīnus trīskāršu standartnovirzi, visaptverošā testēšanā izmanto 11 secīgus atšķaidījumus, un sākuma koncentrācijai jābūt vienai no šādām:

• koncentrācija, kas diapazona noteikšanā dod zemāko koriģēto RLU vērtību;

• maksimālā šķīstošā koncentrācija (sk. 14-2. attēlu antagonistu protokolā (7));

• zemākā citotoksiskā koncentrācija (attiecīgu piemēru sk. 14-3. attēlā antagonistu protokolā (7)).

— 11 atšķaidījumu sērijas pamatā ir atšķaidījumi attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi tālāk aprakstītajiem kritērijiem.

11 punktu atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 jāizmanto, ja šādi iegūtais koncentrāciju diapazons ļauj novērot atbildreakciju pilnu diapazonu, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, kas iegūta diapazona noteikšanas testā. Pretējā gadījumā jāizmanto atšķaidījums attiecībā 1:5.

Visaptverošie testi

31. Visaptveroša testēšana sastāv no 11 punktu atšķaidījumu sērijas (atšķaidījumu sērija attiecībā 1:2 vai 1:5 atbilstīgi visaptverošas testēšanas kritēriju sākuma koncentrācijai), katru koncentrāciju testējot trīs replikāta iedobēs 96 iedobju platē (sk. 3. un 4. attēlu).

— *Agonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto 11 E2 koncentrācijas divos atkārtojumos. Katrā platē ir četras replikāta iedobes DMSO kontrolei un četras replikāta iedobes metoksihlora kontrolei (9,06 x 10^{-6} M).

— *Antagonistu* visaptverošā testēšanā par references standartu izmanto deviņas Ral/E2 koncentrācijas (E2 ir konstants ar 9,18 × 10^{-11} M) divos atkārtojumos, četras replikāta iedobes domātas E2 9,18 x 10^{-11} M kontrolei, četras replikāta iedobes domātas DMSO kontrolēm un vēl četras —tamoksifēnam 3,36 x 10^{-6}M.

▼M8

3. attēls.

Agonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: no TC1-1 līdz TC1-11 =1. testējamās ķimikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-11 =2. testējamās ķimikālijas koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no E2-1 līdz E2-11 = E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); Meth = p,p' metoksihlora vāji pozitīvā kontrole; VC = DMSO (1 % tilpumkoncentrācija) EFM nesēja kontrole.

4. attēls.

Antagonistu visaptveroša testa 96 iedobju plates izkārtojums

	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

Saīsinājumi: E2 = E2 kontrole; no Ral-1 līdz Ral-9 = raloksifena/E2 references standarta koncentrācijas (no augstas līdz zemai); Tam = tamoksifēna/E2 vāji pozitīvā kontrole; no TC1-1 līdz TC1-11 = 1. testējamās ķimikālijas (TC1) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); no TC2-1 līdz TC2-11 = 2. testējamās ķimikālijas (TC2) koncentrācijas (no augstas līdz zemai); VC = nesēja kontrole (DMSO [1 % tilpumkoncentrācijas EFM]).Piezīme. Kā norādīts iepriekš, visās iedobēs, kas satur references standartu un testējamo ķimikāliju, E2 ir konstantā koncentrācijā ($9{,}18 \times 10^{-11}$M).

32. Lai nodrošinātu rezultātu neatkarību, visaptverošos testus ar to pašu ķimikāliju atkārto dažādās dienās. Jāveic vismaz divi visaptveroši testi. Ja testu rezultāti ir savstarpējā pretrunā (piem., viens tests ir pozitīvs, otrs negatīvs) vai ja viens tests ir neadekvāts, jāveic trešais papildu tests.

Luminiscences mērīšana

33. Luminiscenci mēra diapazonā no 300 līdz 650 nm ar inžekcijas luminometru un programmatūru, kas kontrolē inžekcijas tilpumu un mērījumu intervālu (7). Gaismas emisiju no katras iedobes izsaka kā RLU uz katru iedobi.

▼M8

DATU ANALĪZE

EC_{50}/IC_{50} noteikšana

34. EC_{50} vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās efektīvās koncentrācijas [agonisti]) un IC_{50} vērtību (puse no testējamās ķimikālijas maksimālās inhibējošās koncentrācijas [antagonisti]) nosaka, pamatojoties uz koncentrācijas–atbildreakcijas datiem. Testējamajām ķimikālijām, kas ir pozitīvas vienā vai vairākās koncentrācijās, testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas izraisa pusi no maksimālās atbildreakcijas (IC_{50} vai EC_{50}), aprēķina, izmantojot Hilla funkciju vai piemērotu alternatīvu. Hilla funkcija ir četru parametru logistisks matemātisks modelis, kas testējamās ķimikālijas koncentrāciju saista ar atbildreakciju (parasti pēc sigmoidālas līknes), izmantojot tālāk norādīto vienādojumu.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

kur:

Y = atbildreakcija (t. i., RLU);

X = koncentrācijas logaritms;

Bāze = minimālā atbildreakcija;

Virsotne = maksimālā atbildreakcija;

lg EC_{50} (vai lg IC_{50}) = X logaritms, kas atbilst atbildreakcijai, kura atrodas pa vidu starp bāzi un virsotni

Hilla virziena koeficients = līknes stāvums.

Ar šo modeli aprēķina rezultātus, kas ir vissaderīgākie ar vērtībām "Virsotne", "Bāze", "Hilla virziena koeficients", IC_{50} un EC_{50}. EC_{50} un IC_{50} vērtību aprēķināšanai jāizmanto atbilstoša statistiskā programmatūra (piem., Graphpad Prism®).

Izlecošo vērtību noteikšana

35. Lai izdarītu kvalitatīvus statistiskus secinājumus, būtu lietderīgi veikt arī (bet ne tikai) Q-testu (sk. agonistu un antagonistu protokolus (7)), lai noteiktu "nederīgās" iedobes, kas izslēdzamas no datu analīzes.

36. Attiecībā uz E2 references standarta replikātiem (paraugā ir divas iedobes) jebkuru replikāta koriģēto RLU vērtību konkrētā E2 koncentrācijā uzskata par izlecošo vērtību, ja vēsturiskajā datubāzē tās vērtība par vairāk nekā 20 % atšķiras no koriģētās RLU vērtības šai koncentrācijai.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana diapazona noteikšanas testēšanai

37. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā "Testa pieņemamības kritēriji".) Veic šādus aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO nesēja kontroles (VC) vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

▼M8

3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina testējamo ķimikāliju vidējo EC_{50} vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo samazinājumu.

4. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.

5. etaps. Aprēķina testējamo ķimikāliju vidējo IC_{50} vērtību.

Luminometra datu apkopošana un koriģēšana visaptverošai testēšanai

38. Neapstrādātie dati no luminometra jāpārsūta uz testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Jānosaka, vai ir izlecošo vērtību datu punkti, kas jāizslēdz. (Analīzē noteiktos parametrus sk. sadaļā "Testa pieņemamības kritēriji".) Veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina E2 un testējamo ķimikāliju vidējo EC_{50} vērtību.

5. etaps. Aprēķina metoksihlora vidējo koriģēto RLU vērtību.

Antagonists:

1. etaps. Aprēķina DMSO VC vidējo vērtību.

2. etaps. Datu normalizācijas nolūkā šo DMSO VC vidējo vērtību atskaita no vērtības, kas iegūta attiecībā uz katru iedobi.

3. etaps. Aprēķina references standarta (Ral/E2) vidējo vairākkāršo indukciju.

4. etaps. Aprēķina Ral/E2 un testējamo ķimikāliju vidējo IC_{50} vērtību.

5. etaps. Aprēķina tamoksifēna vidējo koriģēto RLU vērtību.

6. etaps. Aprēķina E2 references standarta vidējo vērtību.

▼**M8**

Datu interpretācijas kritēriji

39. VM7Luc ER TA tests ir viens no rīkiem, ko izmanto pierādījumu izsvēršanas pieejā un kas palīdz noteikt, kuras vielas ir prioritāri jātestē ED *in vivo* testos. Šajā prioritizēšanas procedūrā ietilpst testējamās ķimikālijas klasificēšana par pozitīvu vai negatīvu attiecībā uz ER agonistu vai antagonistu aktivitāti. VM7Luc ER TA testa validēšanas pētījumā izmantotie pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji ir aprakstīti 1. tabulā.

1. tabula.

Pozitīvu un negatīvu rezultātu interpretācijas kritēriji

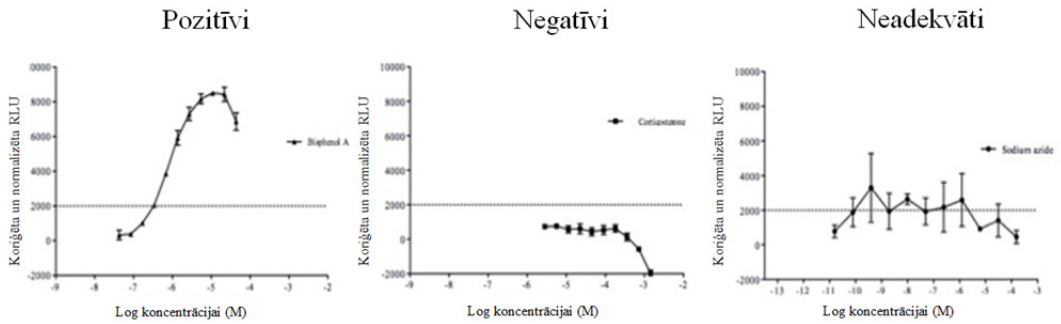
AGONISTU AKTIVITĀTE	
Pozitīvs	— Visas testējamās ķimikālijas, kas klasificētas kā pozitīvas attiecībā uz ER agonistu aktivitāti, ir ar šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija, pozitīvs slīpums un plato vai virsotne. Dažos gadījumos var būt definēti tikai divi no šiem raksturlielumiem (bāzlīnija –slīpums vai slīpums –virsotne). — Uz pozitīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas (vidējais ± SN). Bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert virsotnes punktu vai plato pirmo punktu. — Lai ķimikāliju klasificētu par pozitīvu, atbildreakcijas amplitūdai (starpībai starp bāzlīniju un virsotni) — jābūt vismaz 20 % no references standarta E2 maksimālās vērtības (t. i., 2000 RLU vai vairāk, ja references standarta [E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). — Ja iespējams, EC_{50} vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķimikālijai.
Negatīvs	Vidējā koriģētā RLU konkrētai koncentrācijai ir vienāda ar vai mazāka par DMSO kontroles RLU vidējo vērtību plus trīskārša DMSO RLU standartnovirze.
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķimikālijas jātestē atkārtoti.
ANTAGONISTU AKTIVITĀTE	
Pozitīvs	— No testējamās datiem iegūst šādu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni: bāzlīnija un negatīvs slīpums. — Uz negatīvā slīpuma līnijas ir vismaz trīs punkti, kur kļūdu joslas ar nepārklājas; bāzlīniju veidojošos punktus izslēdz, savukārt līknes lineārā daļa var ietvert plato pirmo punktu. — Aktivitātes samazinājumam jābūt vismaz 20 % no references standarta Ral/E2 maksimālās vērtības (t. i., 8 000 RLU vai mazāk, ja references standarta [Ral/E2] maksimālo atbildreakcijas vērtību koriģē uz 10 000 RLU). — Testējamās ķimikālijas augstākajai necitotoksiskajai koncentrācijai jābūt mazākai par vai vienādai ar 1×10^{-5} M. — Ja iespējams, IC_{50} vērtība jāaprēķina katrai pozitīvai testējamai ķimikālijai.
Negatīvs	Koncentrācijā, kas mazāka par $1{,}0 \times 10^{-5}$ M, visi datu punkti ir virs EC_{80} vērtības (80 % no E2 atbildreakcijas jeb 8 000 RLU).
Neadekvāts	Datus, kurus nozīmīgu kvalitatīvu vai kvantitatīvu ierobežojumu dēļ uzskata par nederīgiem aktivitātes esības vai neesības pierādīšanai, uzskata par neadekvātiem, un tos nevar izmantot, lai noteiktu, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva. Tāpēc ķimikālija jātestē atkārtoti.

▼M8

40. Pozitīvos rezultātus raksturo gan ietekmes intensitāte, gan koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme, ja iespējams. Pozitīvu, negatīvu un neadekvātu rezultātu piemēri sniegti 5. un 6. attēlā.

5. attēls.

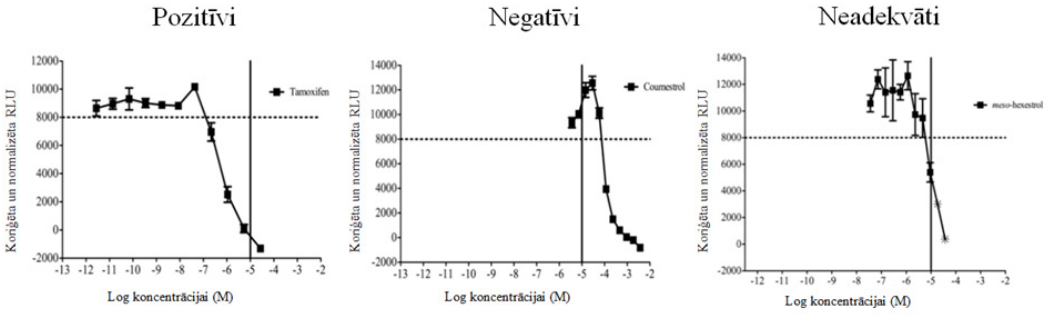
Agonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 20 % no E2 atbildreakcijas, resp. 2000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

6. attēls.

Antagonisti: pozitīvi, negatīvi un neadekvāti rezultāti



Punktētā līnija norāda 80 % no Ral/E2 atbildreakcijas, resp. 8 000 RLU (koriģētas un normalizēta vērtība).

Nepārtrauktā līnija atbilst 1,00 x 10^{-5} M. Lai atbildreakciju uzskatītu par pozitīvu, tai jābūt zem 8 000 RLU līnijas un koncentrācijā, kas mazāka par 1,00 x 10^{-5} M.

Ar zvaigznīti atzīmētās koncentrācijas mezoheksestrola grafikā norāda, ka dzīvotspējas rādītāji ir "2" vai lielāki.

Mezoheksestrola testa rezultātus uzskata par neadekvātiem, jo vienīgā atbildreakcija, kas ir mazāka par 8 000 RLU, ir koncentrācijā 1,00 x 10^{-5} M.

41. EC_{50} un IC_{50} var aprēķināt, izmantojot četru parametru Hilla funkciju (papildinformāciju sk. agonistu protokolā un antagonistu protokolā (7)). Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji, tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā izpildes reizē tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pirmās izpildes reizes rezultātu duplicēšana (sk. 19. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI").

▼**M8**

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

42. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 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, 33: p. 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 No 11-7 850.

(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*.,13(1):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*., 71(10): 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,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10): 4252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 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, 34, 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. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼M8

4. Papildinājums

STABILI TRANSFICĒTU CILVĒKA ESTROGĒNA A RECEPTORU TRANSAKTIVĀCIJAS TESTS ĶIMIKĀLIJU ESTROGĒNISKAS AGONISTU UN ANTAGONISTU AKTIVITĀTES NOTEIKŠANAI, IZMANTOJOT ERA CALUX ŠŪNU LĪNIJU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. ERα CALUX transaktivācijas testā izmanto cilvēka U2OS šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnu agonistu un antagonistu aktivitāti, ko mediē cilvēka estrogēna alfa receptors (hERα). Stabili transficētu ERα CALUX biotesta, ko piedāvā BioDetection Systems BV (Amsterdama, Nīderlande), validēšanas pētījumā pierādīja testa relevantumu un ticamību paredzētajam nolūkam (1). ERα CALUX šūnu līnija ekspresē tikai stabili transficētus cilvēka ERα (2) (3).

2. Šis tests ir īpaši paredzēts hERα mediētas transaktivācijas noteikšanai, par mērījuma parametru izmantojot bioluminiscenci. Augstās signāla un trokšņa attiecības dēļ bioluminiscenci plaši izmanto biotestos (4).

3. Novērots, ka fitoestrogēni koncentrācijā, kas ir lielāka par 1 μM, pārmērīgi aktivē luciferāzes reportiergēnu, tā izraisot receptoru nemediētu luminiscenci (5) (6) (7). Tāpēc stabili transficētu ER transaktivācijas testos rūpīgi jāpārbauda fitoestrogēnu vai citu līdzīgu savienojumu, kas var pārmērīgi aktivēt luciferāzes ekspresiju, augstākas koncentrācijas (sk. 2. papildinājumu).

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem ir jāizlasa sadaļa "VISPĀRĪGAIS IEVADS" un "ER TA TESTA KOMPONENTI". Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. Biotestu izmanto, lai novērtētu ER ligandu saistīšanos un receptoru–ligandu kompleksa sekojošu translokāciju uz kodolu. Kodolā receptoru–ligandu komplekss saista īpašus DNS atbildreakcijas elementus un transaktivē jāņtārpiņu luciferāzes reportiergēnu, kā rezultātā palielinās luciferāzes fermenta šūnu ekspresija. Pēc luciferāzes substrāta luciferīna pievienošanas luciferīns pārvēršas par bioluminiscējošu produktu. Radīto gaismu var viegli uztvert un kvantitatīvi noteikt ar luminometru.

6. Testa sistēmā izmanto stabili transficētu ERα CALUX šūnas. ERα CALUX šūnas izveidotas no cilvēka osteoblastiskas osteosarkomas U2OS šūnu līnijas. Cilvēka U2OS šūnas stabili transficēja ar 3xHRE-TATA-Luc un pSG5-neo-hERα, izmantojot kalcija fosfāta līdznogulsnēšanās metodi. U2OS šūnu līnija tika izvēlēta kā labākais variants, ko izmantot kā reportieršūnu līniju, kas reaģē uz estrogēnu (un citiem steroīdajiem hormoniem), un tā pamatā ir novērojums, ka U2OS šūnu līnijā endogēnisko receptoru aktivitāte bija neliela vai tās nebija vispār. Endogēnisko receptoru neesamību novērtēja tikai ar luciferāzes reportierplazmīdām, un pēc receptoru ligandu pievienošanas netika konstatēta nekāda aktivitāte. Turklāt pēc radniecīgu receptoru pagaidu pievienošanas šī šūnu līnija uzturēja spēcīgas hormonu mediētas atbildreakcijas (2) (3) (8).

7. Ķimikāliju testēšanā ar ERα CALUX šūnu līniju, lai noteiktu estrogēnisku vai antiestrogēnisku aktivitāti, ietilpst priekšskrīnings un visaptveroši testi. Priekšskrīninga laikā visaptverošās testēšanas vajadzībām nosaka testējamo ķimikāliju šķīdību, citotoksicitāti un precīzāku koncentrāciju diapazonu.

▼M8

Visaptverošajos testos testējamo ķimikāliju precīzāko koncentrāciju diapazonu testē ERα CALUX biotestos, un pēc tam testējamās ķimikālijas klasificē pēc agonisma vai antagonisma.

8. Datu interpretācijas kritēriji ir detalizēti aprakstīti 59. punktā. Īsumā, testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz agonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķimikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta (17β-estradiola) maksimālās atbildreakcijas (PC_{10}). Testējamo ķimikāliju uzskata par pozitīvu attiecībā uz antagonismu, ja vismaz divu secīgu testējamās ķimikālijas koncentrāciju atbildreakcija ir vienāda ar vai mazāka par 80 % no references standarta (tamoksifēna) maksimālās atbildreakcijas (PC_{80}).

PROCEDŪRA

Šūnu līnija

9. Testam jāizmanto stabili transficēta U2OS ERα CALUX šūnu līnija. Šūnu līniju var iegādāties ar tehniskās licences līgumu no BioDetection Systems BV, Amsterdama, Nīderlande.

10. Drīkst izmantot tikai šūnu kultūras bez mikoplazmas. Jābūt apliecinājumam, ka izmantojamajās šūnu partijās nav mikoplazmas piesārņojuma, vai arī pirms lietošanas jāveic mikoplazmas tests. Precīzai mikoplazmas infekcijas noteikšanai jāizmanto RT-PCR (polimerāzes ķēdes reakcija reāllaikā) (9).

Šūnu līnijas stabilitāte

11. Lai saglabātu CALUX šūnu stabilitāti un integritāti, šūnas jāglabā šķidrajā slāpeklī (-80^0C). Pēc šūnu atkausēšanas jaunas kultūras aizsākšanai šūnas jāsubkultivē vismaz divreiz, tikai pēc tam tās drīkst izmantot ķimikāliju estrogēniskas agonistu un antagonistu aktivitātes novērtēšanai. Šūnas nedrīkst subkultivēt vairāk nekā 30 pasāžās.

12. Lai kontrolētu šūnu līnijas stabilitāti laika gaitā, agonistu un antagonistu testa sistēmas reaģētspēju verificē, novērtējot references standarta EC_{50} vai IC_{50}. Tāpat jākontrolē arī pozitīvās kontroles parauga (PC) un negatīvās kontroles parauga (NC) relatīvā indukcija. Rezultātiem jāatbilst agonistu (3.C tabula) vai antagonistu ERα CALUX biotesta (4.C tabula) pieņemamības kritērijiem. References standarti, pozitīvās un negatīvās kontroles ir norādītas 1. tabulā (agonisms) un 2. tabulā (antagonisms).

Šūnu kultivēšanas un uzsēšanas apstākļi

13. U2OS šūnas jākultivē barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne ar fenolsarkano kā pH indikatoru, kam pievienots liellopu embriju serums (7,5 %), aizvietojamās aminoskābes (1 %), 10 vienības/ml penicilīna, streptomicīna un geneticīna (G-418) kā atlases marķieris). Šūnas jāievieto CO_2 inkubatorā (5 % CO_2) 370C temperatūrā un 100 % mitrumā. Kad šūnas sasniedz 85–95 % konfluenci, tās jāsubkultivē vai jāsagatavo uzsēšanai 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs. Ja šūnas gatavo uzsēšanai, tās atkārtoti jāsuspendē 1 x 105 šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē (DMEM/F12 (1:1) barotne bez fenolsarkanā, kam pievienots liellopu embriju serums (5 % tilpumkoncentrācija), kas apstrādāts ar dekstrāna pārklātu ogli, aizvietojamās aminoskābes (1 % tilpumkoncentrācija), 10 vienības/ml penicilīna un streptomicīna) un jāuzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (100 µl homogenizētas šūnu suspensijas). Pirms ekspozīcijas šūnas 24 stundas vispirms jāinkubē CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 ^{0}C, 100 % mitrums). Plastmasas izstrādājumi nedrīkst saturēt estrogēnu.

▼M8

Pieņemamības kritēriji

14. Testējamās(-o) ķimikālijas(-u) agonistisko un antagonistisko aktivitāti testē testu sērijā. Testu sērijā ietilpst ne vairāk kā 6 mikrotitrēšanas plates. Katrā testu sērijā ietilpst references standarta, pozitīvās kontroles parauga, negatīvās kontroles parauga un šķīdinātāja kontroļu vismaz 1 pilna atšķaidījumu sērija. 1. un 2. attēlā parādīta plašu sagatavošana agonistu un antagonistu testu sērijai.

15. Katrs references standartu, testējamo ķimikāliju, visu šķīdinātāja kontroļu un pozitīvo un negatīvo kontroļu atšķaidījums jāanalizē trīs atkārtojumos. Katras trīs atkārtojumos veiktās analīzes rezultātiem jāatbilst 3.A un 4.A tabulā norādītajām prasībām.

16. References standarta (17β-estradiols agonisma noteikšanai; tamoksifēns antagonisma noteikšanai) pilnu atšķaidījumu sēriju mēra katras testu sērijas pirmajā platē. Lai atlikušo 5 mikrotitrēšanas plašu analīzes rezultātus varētu salīdzināt ar pirmās mikrotitrēšanas plates rezultātiem, kas satur references standarta pilnu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni, visās platēs jābūt 3 kontroles paraugiem: šķīdinātāja kontrolei, testētajam references standartam visaugstākajā koncentrācijā un references standarta aptuvenās EC_{50} (agonisms) vai IC_{50} (antagonisms) koncentrācijas. Vidējo kontroles paraugu attiecībai pirmajā platē un pārējās 5 platēs jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

17. Katrai mikrotitrēšanas platei testu sērijā aprēķina z faktoru (10). Z faktors jāaprēķina pēc atbildreakcijām pie references standarta augstākajām un zemākajām koncentrācijām. Mikrotitrēšanas plati uzskata par derīgu, ja tā atbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

18. References standarta devas–atbildreakcijas līknei jābūt sigmoidālai. EC_{50} vai IC_{50}, kas iegūta references standarta atšķaidījumu sērijā, ir jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

19. Katrā testu sērijā jābūt pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles paraugam. Relatīvajai indukcijai, kas aprēķināta, pamatojoties uz pozitīvās kontroles paraugu un negatīvās kontroles paraugu, jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām prasībām.

20. Visā mērījumu laikā jānosaka, kāds ir references standarta augstākās koncentrācijas indukcijas koeficients, proti, vidējo augstāko 17β-estradiola references standarta relatīvās gaismas vienības (RLU) atbildreakciju dala ar vidējo references šķīdinātāja kontroles RLU atbildreakciju. Šim indukcijas koeficientam jāatbilst 3.C tabulā (agonisms) vai 4.C tabulā (antagonisms) norādītajām minimālajām prasībām par vairākkāršo indukciju.

21. Tikai tās mikrotitrēšanas plates, kas atbilst visiem iepriekš minētajiem apstiprināšanas kritērijiem, uzskatāmas par derīgām un izmantojamas testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai.

22. Pieņemamības kritērijus piemēro gan priekšskrīningam, gan visaptverošiem testiem.

▼M8

1. tabula.

References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas agonistu CALUX biotestam

	Viela	*CAS* reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	17β-estradiols	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Pozitīvā kontrole (PC)	17α-metiltestosterons	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatīvā kontrole (NC)	kortikosterons	50-22-6	$1*10^{-8}$

2. tabula.

References standarta, pozitīvās kontroles (PC) un negatīvās kontroles (NC) koncentrācijas antagonistu CALUX biotestam

	Viela	*CAS* reģ. nr.	Testa diapazons (M)
References standarts	tamoksifēns	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Pozitīvā kontrole (PC)	4-hidroksitamoksifēns	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatīvā kontrole (NC)	resveratrols	501-36-0	$1{,}0*10^{-5}$

3. tabula.

Pieņemamības kritēriji agonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		**Kritērijs**
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, izņemot C0)	< 15 %
2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (references standartam un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrolēm (C0, SC))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %
B — vienā mikrotitrēšanas platē		
4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.–x. plate)	no 0,5 līdz 2,0
5	Attiecība starp apt. EC_{50} un references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un apt. EC_{50} un references standarta augstāko koncentrāciju 2.–x. platē (C4, C8)	no 0,70 līdz 1,30
6	Z faktors katrai platei	>0,6
C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)		
7	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (17ß-estradiols)
8	References standarta (17ß-estradiols) EC_{50} diapazons	$4 * 10^{-12}$–$4 * 10^{-11}$ M
9	Augstākās 17ß-estradiola koncentrācijas minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz references standarta šķīdinātāja kontroli	5
10	Relatīvā indukcija (%) PC	> 30 %
11	Relatīvā indukcija (%) NC	<10 %

▼M8

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

4. tabula.

Pieņemamības kritēriji antagonistu ERα CALUX biotestam

A — atsevišķi paraugi platē		**Kritērijs**
1	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (NC, PC, katram testējamās ķimikālijas un references standarta atšķaidījumam, šķīdinātāja kontrolei (C0))	< 15 %
2	Trīs atkārtojumu iedobju maksimālā %SN (nesēja kontrolei (VC) un references standarta augstākajai koncentrācijai (C8))	< 30 %
3	LDH maksimālā noplūde kā citotoksicitātes mērījums	< 120 %
B — vienā mikrotitrēšanas platē		
4	Attiecība starp references standarta šķīdinātāja kontroli (C0; 1. plate) un testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroli (SC; 2.–x. plate)	no 0,70 līdz 1,30
5	Attiecība starp apt. IC_{50} references standarta koncentrāciju 1. platē un apt. IC_{50} references standarta koncentrāciju 2.–x. platē (C4)	no 0,70 līdz 1,30
6	Attiecība starp references standarta augstāko koncentrāciju 1. platē un references standarta augstāko koncentrāciju 2.–x. platē (C8)	no 0,50 līdz 2,0
7	Z faktors katrai platei	>0,6
C — analīžu vienā sērijā (visas plates vienā sērijā)		
8	References standarta sigmoidāla līkne	Jā (tamoksifēns)
9	References standarta (tamoksifēns) IC_{50} diapazons	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	References standarta šķīdinātāja kontroles minimālā vairākkāršā indukcija attiecībā uz tamoksifēna augstāko koncentrāciju	2,5
11	Relatīvā indukcija (%) PC	<70 %
12	Relatīvā indukcija (%) NC	>85 %

Apt.: aptuveni; PC: pozitīvā kontrole; NC: negatīvā kontrole; VC: nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta konstantas koncentrācijas); SC: testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole; C0: references standarta šķīdinātāja kontrole; SD: standartnovirze LDH: laktātdehidrogenāze.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles

23. Gan priekšskrīningā, gan visaptverošā testā jāizmanto viena un tā pati šķīdinātāja/nesēja kontrole, references standarti, pozitīvās kontroles un negatīvās kontroles. Arī references standartu, pozitīvo kontroļu un negatīvo kontroļu koncentrācijai jābūt tādai pašai.

▼**M8**

Šķīdinātāja kontrole

24. Šķīdinātāju, kurā izšķīdina testējamo ķimikāliju, testē kā šķīdinātāja kontroli. ERα CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas jātestē tajā pašā nesējā. Jāievēro, ka šķīdinātāja kontrole antagonistu pētījumiem satur noteiktas koncentrācijas agonistu references standartu 17β-estradiolu (aptuveni EC_{50} koncentrācija). Lai testētu antagonistu pētījumiem izmantojamo šķīdinātāju, jāsagatavo un jātestē nesēja kontrole.

Nesēja kontrole (antagonisms)

25. Lai testētu antagonismu, testa barotnei pievieno agonistu references standartu (17β-estradiolu) konstantā koncentrācijā (aptuveni EC_{50} koncentrācija). Lai noteiktu testējamo ķimikāliju izšķīdināšanai izmantojamā šķīdinātāja antagonismu, jāsagatavo testa barotne, kas nesatur agonistu references standartu (17β-estradiola) konstantā koncentrācijā. Šis kontroles paraugs paredzēts kā nesēja kontrole. Dimetilsulfoksīds (DMSO, 1 % (tilp./tilp.); ERα CALUX biotesta validēšanai kā nesēju izmantoja dimetilsulfoksīdu (DMSO, 1 % (tilpumkoncentrācija); CAS Nr. 67-68-5). Ja izmanto citu šķīdinātāju, nevis DMSO, visi references standarti, kontroles un testējamās ķimikālijas jātestē tajā pašā nesējā.

Izmantojamie standarti

26. Agonistu references standarts ir 17β-estradiols (1. tabula). References standarts nozīmē 17β-estradiola astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistu references standarts ir tamoksifēns (2. tabula). References standarts nozīmē tamoksifēna astoņu koncentrāciju atšķaidījumu sēriju ($3*10^{-09}$, $1*10^{-08}$, $3*10^{-08}$, $1*10^{-07}$, $3*10^{-07}$, $1*10^{-06}$, $3*10^{-06}$, $1*10^{-05}$ M). Antagonistu references standarta katru koncentrāciju inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

Pozitīvā kontrole

28. Pozitīvā kontrole agonistu pētījumiem ir 17α-metiltestosterons (1. tabula).

29. Pozitīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir 4-hidroksitamoksifēns (2. tabula). Antagonistu pozitīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

Negatīvā kontrole

30. Negatīvā kontrole agonistu pētījumiem ir kortikosterons (1. tabula).

31. Negatīvā kontrole antagonistu pētījumiem ir resveratrols (2. tabula). Antagonistu negatīvo kontroli inkubē kopā ar agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M).

▼M8

Laboratorijas kompetences pierādīšana (sk. 14. punktu un 3. un 4. tabulu šīs testēšanas metodes sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI")

Nesējs

32. Testējamo ķimikāliju izšķīdināšanai izmantojamajam šķīdinātājam pilnībā jāizšķīdina testējamā ķimikālija, un tam jābūt sajaucamam ar šūnu barotni. Piemēroti šķīdinātāji ir DMSO, ūdens un etanols (tīrība no 95 % līdz 100 %). Ja kā šķīdinātāju izmanto DMSO, inkubēšanas laikā DMSO maksimālā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 % (tilpumkoncentrācija). Pirms lietošanas jāpārbauda, vai šķīdinātājs nav citotoksisks un neietekmē testa veikšanu.

References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju sagatavošana

33. References standartus, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un testējamās ķimikālijas izšķīdina 100 % DMSO (vai piemērotā šķīdinātājā). Pēc tam tajā pašā šķīdinātājā sagatavo attiecīgus (sērijveida) atšķaidījumus. Pirms izšķīdināšanas jānogaida, līdz visas vielas sasilst līdz istabas temperatūrai. Svaigi sagatavotos references standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju izejšķīdumos nedrīkst būt redzamas nogulsnes vai duļķes. References standartu un kontroļu izejšķīdumus var sagatavot lielā apjomā. Pirms katra eksperimenta jāsagatavo svaigi testējamo ķimikāliju izejšķīdumi. References standartu, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un testējamo ķimikāliju galīgie atšķaidījumi katram eksperimentam jāsagatavo svaigi un jāizmanto 24 stundās pēc sagatavošanas.

Šķīdība, citotoksicitāte un diapazona noteikšana

34. Priekšskrīningā nosaka testējamo ķimikāliju šķīdību izvēlētajā šķīdinātājā. Sagatavo izejšķīdumu ar maksimālo koncentrāciju 0,1 M. Ja šādā koncentrācijā ir šķīdības problēmas, jāsagatavo mazākas koncentrācijas izejšķīdumi, līdz testējamās ķimikālijas izšķīst pilnībā. Priekšskrīningā testē testējamo ķimikāliju 1:10 sērijveida atšķaidījumus. Agonistu vai antagonistu testēšanā maksimālā testa koncentrācija ir 1 mM. Pēc priekšskrīninga iegūst precīzāku testējamo ķimikāliju koncentrāciju diapazonu, kas jātestē visaptverošajā testā. Visaptverošā testēšanā izmantojamajiem atšķaidījumiem jābūt 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x un 3 000x.

35. Agonistu un antagonistu testu protokolos ir ietverta citotoksicitātes testēšana (11). Citotoksicitātes testēšana ir iekļauta gan priekšskrīningā, gan visaptverošajā testā. ERα CALUX biotesta validēšanas laikā citotoksicitātes novērtēšanai izmantotā metode bija laktātdehidrogenāzes (LDH) noplūdes tests kombinācijā ar šūnu kvalitatīvu vizuālu pārbaudi (sk. 4.1. papildinājumu) pēc eksponēšanas testējamām ķimikālijām. Tomēr citotoksicitātes noteikšanai var izmantot citas kvantitatīvas metodes (piem., uz tetrazolu balstītu kolorimetrisko (MTT) testu vai citotoksicitātes CALUX biotestu). Parasti testējamo ķimikāliju koncentrācijas, pie kādām šūnu dzīvotspēja samazinās par vairāk nekā 20 %, uzskatāmas par citotoksiskām, tāpēc tās nav izmantojamas datu novērtēšanai. Attiecībā uz LDH noplūdes testu testējamās ķimikālijas koncentrācija uzskatāma par citotoksisku, ja LDH noplūdes procents ir lielāks par 120 %.

▼M8

Eksponēšana testējamai ķimikālijai un izkārtojums testa platē

36. Pēc saplūdušu kultivētu šūnu kolbas tripsinizācijas šūnas atkārtoti suspendē 1 x 10^5 šūnas/ml bezestrogēna testa barotnē. Simts µl atkārtoti suspendētu šūnu uzsēj 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iekšējās iedobēs. Ārējās iedobēs iepilda 200 µl fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma (PBS) (sk. 1. un 2. attēlu). Uzsētās šūnas 24 stundas vispirms inkubē CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 °C, 100 % mitrums).

37. Pēc preinkubācijas plates vizuāli pārbauda, lai noteiktu citotoksicitāti (sk. 4.1. papildinājumu), kontamināciju un konfluenci. Testēšanai izmanto tikai tās plates, kurās nav redzamas citotoksicitātes un kontamināciju un ir vismaz 85 % konfluences. No iekšējām iedobēm uzmanīgi izvada barotni, ko aizstāj ar 200 µl bezestrogēna testa barotnes, kas satur references standartu, testējamo ķimikāliju, pozitīvo kontroļu, negatīvo kontroļu un šķīdinātāja kontroļu attiecīgo atšķaidījumu sēriju (5. tabula: agonistu pētījumi; 6. tabula: antagonistu pētījumi). Visus references standartus, testējamās ķimikālijas, pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un šķīdinātāja kontroles testē trīs atkārtojumos. 1. attēlā redzams plates izkārtojums agonistu testēšanai. 2. attēlā redzams plates izkārtojums antagonistu testēšanai. Plates izkārtojums priekšskrīningā un visaptverošajā testēšanā ir vienāds. Antagonistu testēšanā visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17β-estradiols) konstantā koncentrācijā (3 * 10^{-12} M). Jāievēro, ka katrā TC platē jāpievieno references standarti C8 un C4.

38. Pēc šūnu eksponēšanas visām ķimikālijām 96 iedobju mikrotitrēšanas plates jāinkubē vēl 24 stundas CO_2 inkubatorā (5 % CO_2, 37 °C, 100 % mitrums).

1. attēls.

Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	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												

Nākamās plates

	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 = references standartšķīdinātājs.

C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).

▼M8

PC = pozitīvā kontrole.

NC: = negatīvā kontrole.

TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.

SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijas).

Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 µl PBS.

2. attēls.

Izkārtojums 96 iedobju mikrotitrēšanas plates priekšskrīningā un antagonistiskās iedarbības novērtēšanā

1. plate

	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												

Nākamās plates

	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 = references standartšķīdinātājs.

C(1-8) = references standarta atšķaidījumu sērija (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai).

NC: = negatīvā kontrole.

PC = pozitīvā kontrole.

TCx-(1–8) = testējamās ķimikālijas atšķaidījumi (1–8, no zemas līdz augstai koncentrācijai), ko izmanto testējamās ķimikālijas priekšskrīningā un agonistiskās iedarbības novērtēšanā.

SC = testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole (optimāli tas pats šķīdinātājs, kas ir C0, taču, iespējams, no citas partijas).

VC = nesēja kontrole (šķīdinātāja kontrole bez agonistu references standarta (17β-estradiola) konstantā koncentrācijā.

Pelēkās šūnas: = ārējās iedobes, kurās iepilda 200 µl PBS.

Piezīme. Visās iekšējās iedobēs, izņemot nesēja kontroles (VC) iedobes, ir arī agonistu references standarts (17β-estradiols) konstantā koncentrācijā ($3,0 * 10^{-12}$ M).

Luminiscences mērīšana

39. Luminiscences mērīšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Barotne no iedobēm jāizvada, bet šūnas pēc 24 stundu inkubēšanas jālizē, lai atvērtu šūnas membrānu un varētu izmērīt luciferāzes aktivitāti.

▼M8

40. Luminiscences izmērīšanai šajā procedūrā nepieciešams luminometrs ar 2 inžektoriem. Luciferāzes reakciju sāk, inžektējot substrāta luciferīnu. Reakciju pārtrauc, pievienojot 0,2 M NaOH. Reakciju pārtrauc, lai nepieļautu luminiscences pārnešanu no vienas iedobes citā.

41. No katras iedobes izstaroto gaismu izsaka kā relatīvās gaismas vienības (RLU) uz katru iedobi.

Priekšskrīnings

42. Priekšskrīninga analīzes rezultātus izmanto, lai noteiktu visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāku koncentrāciju diapazonu. Priekšskrīninga analīzes rezultātu novērtēšana un visaptverošajā testēšanā testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšana ir detalizēti aprakstīta agonistu un antagonistu testu protokolā (10). Šeit ir sniegts īss kopsavilkums par testējamo ķimikāliju precīzāka koncentrāciju diapazona noteikšanu agonistu un antagonistu testēšanā. Norādījumus par sērijveida atšķaidījumiem sk. 5. un 6. tabulā.

Koncentrāciju izvēle agonistiskās iedarbības novērtēšanai

43. Priekšskrīningā testējamās ķimikālijas jātestē, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.

44. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

45. Testējamo ķimikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:

— novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķimikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;

— testējamās ķimikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu indukciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķimikālijas koncentrācijām.

46. Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo indukciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķimikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.

47. Testējamās ķimikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jāsagatavo atbilstoši 5. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.

▼M8

48. Testējamā ķimikālija, kas neizraisa nekādu agonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā.

Koncentrāciju izvēle antagonistiskās iedarbības novērtēšanai

49. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

50. Testējamo ķimikāliju sākotnējie koncentrāciju diapazoni jākoriģē un priekšskrīnings jāatkārto, ja:

— novēro citotoksicitāti. Priekšskrīninga procedūra jāatkārto ar testējamās ķimikālijas mazākām, necitotoksiskām koncentrācijām;

— testējamās ķimikālijas priekšskrīningā neiegūst pilnu devas–atbildreakcijas līkni, jo testētās koncentrācijas rada maksimālu inhibīciju. Priekšskrīnings jāatkārto ar mazākām testējamās ķimikālijas koncentrācijām.

51. Ja novēro derīgu, no devas atkarīgu atbildreakciju, jāizvēlas (mazākā) koncentrācija, kādā novēro maksimālo inhibīciju un nenovēro citotoksicitāti. Testējamās ķimikālijas augstākajai koncentrācijai, kas jātestē visaptverošajā testā, jābūt 3 reizes lielākai par šo izvēlēto koncentrāciju.

52. Testējamās ķimikālijas visa precīzāku atšķaidījumu sērija jāsagatavo atbilstoši 6. tabulā norādītajiem atšķaidīšanas etapiem, sākot ar minēto augstāko koncentrāciju.

53. Testējamā ķimikālija, kas neizraisa nekādu antagonistisku iedarbību, jātestē visaptverošajos testos, sākot ar augstāko necitotoksisko koncentrāciju, kas konstatēta priekšskrīningā..

Visaptverošie testi

54. Kad noteikts precīzākais koncentrāciju diapazons, testējamās ķimikālijas jātestē visaptverošajā testā, izmantojot 5. tabulā (agonisms) un 6. tabulā (antagonisms) norādītās atšķaidījumu sērijas. Visas koncentrācijas jātestē trīs atkārtojumu iedobēs atbilstoši 1. attēlā (agonisms) vai 2. attēlā (antagonisms) norādītajam plašu izkārtojumam.

55. Tikai pieņemamības kritērijiem atbilstoši analīzes rezultāti (3.un 4. tabula) uzskatāmi par derīgiem un izmantojami testējamo ķimikāliju atbildreakcijas novērtēšanai. Ja viena vai vairākas mikrotitrēšanas plates analīzes sērijā neatbilst pieņemamības kritērijiem, attiecīgās mikrotitrēšanas plates jāanalizē atkārtoti. Ja pirmā plate, kura satur visu references standarta atšķaidījumu sēriju, neatbilst pieņemamības kritērijiem, visa testa sērija (6 plates) jāanalizē atkārtoti.

▼**M8**

5. tabula.

References standartu, kontroļu un testējamo ķimikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto agonistu testēšanā

References standarts 17β-estradiols		TCx — priekšskrīnings		TCx — visaptverošais tests		Kontroles	
konc. (M)		atšķaidījums		atšķaidījums		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC:	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx — testējamā ķimikālija x.
PC — pozitīvā kontrole (17α-metiltestosterons).
NC — negatīvā kontrole (kortikosterons).
C0 — references standarta šķīdinātāja kontrole
SC — testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole

▼M8

6. tabula.

References standartu, kontroļu un testējamo ķimikāliju koncentrācija un atšķaidījumi, ko izmanto antagonistu testēšanā

References standarts tamoksifēns		TCx — priekšskrīnings		TCx — visaptverošais tests		Kontroles	
konc. (M)		atšķaidījums		atšķaidījums		konc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC:	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Pievienotais agonists**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiols	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx — testējamā ķimikālija x.
PC — pozitīvā kontrole (4-hidroksitamoksifēns)
NC — negatīvā kontrole (resveratrols).
C0 — references standarta šķīdinātāja kontrole
SC — testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontrole
VC — nesēja kontrole (nesatur agonistu references standartu 17β-estradiolu konstantā koncentrācijā ($3 * 10^{-12}$ M)

▼M8

Datu apkopošana un datu analīze

56. Agonistu testēšana: [pēc priekšskrīninga un visaptverošajiem testiem nosaka testējamās ķimikālijas EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} un maksimālo indukciju (TCx_{max}). Antagonistu testēšana: aprēķina IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} un minimālo indukciju (TCx_{min}). 3. attēlā (agonisms) un 4. attēlā (antagonisms) šie parametri attēloti grafiski. Nepieciešamos parametrus aprēķina, pamatojoties uz katras testējamās ķimikālijas relatīvo indukciju (attiecībā pret references standarta maksimālo indukciju (= 100 %)). Datu novērtēšanai jāizmanto nelineārā regresija (mainīgs slīpums, 4 parametri) atbilstoši šim vienādojumam:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

kur:

X = devas vai koncentrācijas logaritms;

Y = atbildreakcija (relatīvā indukcija (%));

Virsotne = maksimālā indukcija (%)

Bāze = minimālā indukcija (%);

$LogEC_{50}$ = koncentrācijas, pie kuras novēro 50 % no maksimālās atbildreakcijas, logaritms

Hilla virziena koeficients = Virziena koeficients vai Hilla virziena koeficients.

57. Neapstrādātie dati no luminometra, kas izteikti kā relatīvās gaismas vienības (RLU), jāpārsūta uz priekšskrīningam un visaptverošajam testam īpaši izveidotu izklājlapas veidni. Neapstrādātajiem datiem jāatbilst 3.A un 3.B tabulā (agonisms) vai 4.A un 4.B tabulā (antagonisms) norādītajiem pieņemamības kritērijiem. Ja neapstrādātie dati atbilst pieņemamības kritērijiem, nepieciešamo parametru noteikšanai veic tālāk aprakstītos aprēķinus.

Agonisms

— References standarta šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.

— Testējamās ķimikālijas šķīdinātāja kontroles vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem datiem par testējamo ķimikāliju.

— Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta augstākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.

— Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta augstāko koncentrāciju 100 %.

— Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.

▼**M8**

— Nosaka references standarta EC_{50} un EC_{10}.

— Nosaka testējamo ķimikāliju EC_{50} un EC_{10}.

— Nosaka testējamās ķimikālijas maksimālo relatīvo indukciju (TC_{max}).

— Nosaka testējamo ķimikāliju PC_{10} un PC_{50}.

Testējamām ķimikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī EC_{50}, EC_{10} un PC_{50}. Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC_{10} un TC_{max}.

Antagonisms

— References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par references standartiem.

— References standarta augstākās koncentrācijas vidējo RLU atņem no neapstrādātajiem atsauces datiem par testējamām ķimikālijām.

— Aprēķina references standarta katras koncentrācijas relatīvo indukciju. References standarta zemākās koncentrācijas indukcija ir 100 %.

— Aprēķina testējamās ķimikālijas katras koncentrācijas relatīvo indukciju salīdzinājumā ar references standarta zemāko koncentrāciju 100 %.

— Pēc nelineārās regresijas (mainīgs slīpums, 4 parametri) novērtē analīzes rezultātus.

— Nosaka references standarta IC_{50} un IC_{20}.

— Nosaka testējamo ķimikāliju IC_{50} un IC_{20}.

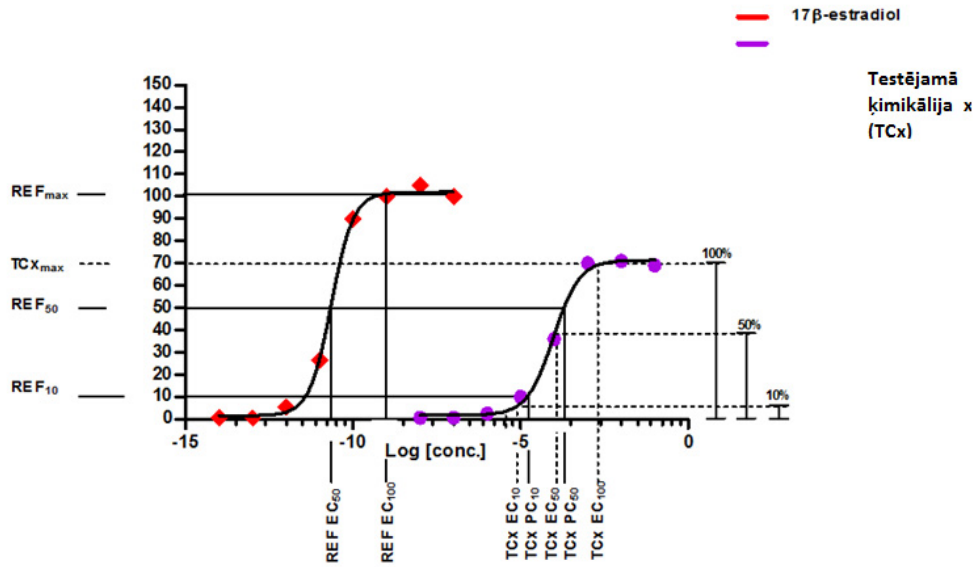
— Nosaka testējamās ķimikālijas minimālo relatīvo indukciju (TC_{min}).

— Nosaka testējamo ķimikāliju PC_{80} un PC_{50}.

▼M8

3. attēls.

Pārskats par agonistu testā noteiktajiem parametriem



EC_{10} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 10 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

EC_{50} = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas.

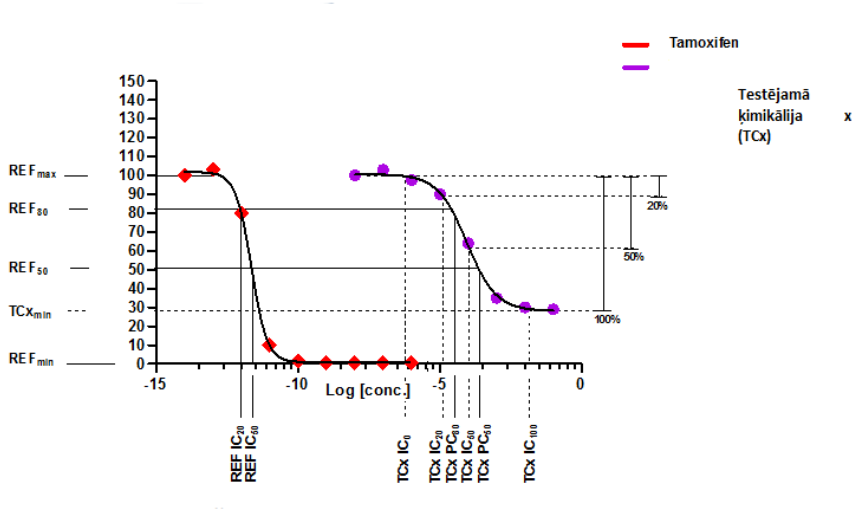
PC_{10} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{10}.

PC_{50} = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta EC_{50}.

TCx_{max} = testējamās ķimikālijas maksimālā relatīvā indukcija.

4. attēls.

Pārskats par antagonistu testā noteiktajiem parametriem



IC20 = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 80 % no tās maksimālās atbildreakcijas (20 % inhibīcija).

▼M8

IC50 = vielas koncentrācija, pie kuras novēro 50 % no tās maksimālās atbildreakcijas (50 % inhibīcija).

PC80 = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC_{20}.

PC50 = testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras tās atbildreakcija ir vienāda ar references standarta IC_{50}.

TCxmin = testējamās ķimikālijas minimālā relatīvā indukcija.

Testējamām ķimikālijām ne vienmēr var iegūt pilnu devas–atbildreakcijas līkni, piem., citotoksicitātes vai šķīdības problēmu dēļ. Tad nav iespējams noteikt arī IC_{50}, IC_{20} un PC_{50}. Tādos gadījumos iespējams noteikt tikai PC_{20} un TC_{min}.

58. Rezultātu pamatā ir divas (vai trīs) neatkarīgas izpildes reizes. Ja divās izpildes reizēs tiek iegūti salīdzināmi un līdz ar to reproducējami rezultāti, nav nepieciešams testu izpildīt vēl trešo reizi. Rezultāti ir pieņemami, ja tie:

— atbilst pieņemamības kritērijiem (sk. 14.–22. punktu sadaļā "Pieņemamības kritēriji");

— ir reproducējami.

Datu interpretācijas kritēriji

59. Interpretējot datus un lemjot, vai testējamā ķimikālija ir pozitīva vai negatīva, jāizmanto tālāk aprakstītie kritēriji.

Agonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

1 TC_{max} ir vienāda ar vai lielāka par 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10}).

2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10}.

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

1 TC_{max} nepārsniedz 10 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{10});

2 mazāk nekā 2 testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{10}.

Antagonisms

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **pozitīvu**, ja:

1 TC_{min} ir vienāda ar vai mazāka par 80 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{80} = 20 % inhibīcija).

2 Vismaz 2 secīgas testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai mazākas par REF_{80}.

▼**M8**

Katrā visaptverošajā testā testējamo ķimikāliju uzskata par **negatīvu**, ja:

1 TC_{min} pārsniedz 80 % no references standarta maksimālās atbildreakcijas (REF_{80} = 20 % inhibīcija).

2 Mazāk nekā 2 testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir vienādas ar vai lielākas par REF_{80}.

60. Lai raksturotu testējamās ķimikālijas pozitīvās atbildreakcijas potenci, apskata šādus parametrus: ietekmes intensitāte (agonisms: TC_{max}; antagonisms: TC_{min}) un koncentrācija, pie kuras novērojama ietekme (agonisms: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonisms: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. 20. punktu sadaļā "ER TA TESTA KOMPONENTI".

LITERATŪRA

(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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, 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.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and 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* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (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.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

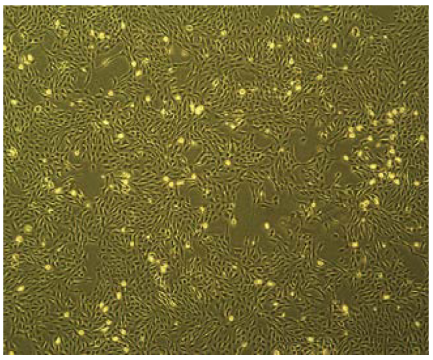
▼**M8**

4.1. Papildinājums

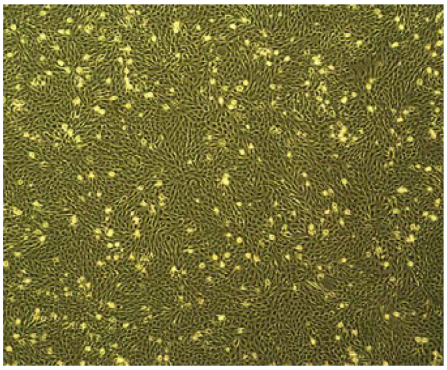
PAPILDINĀJUMS. ŠŪNU DZĪVOTSPĒJAS VIZUĀLA PĀRBAUDE



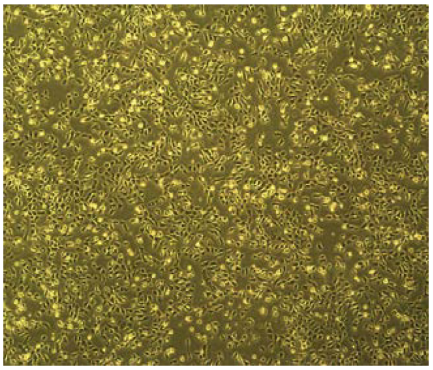
Konfluence < 5 %. Šūnas ir tikko uzsētas. Šūnu dzīvotspēja 100 %. Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



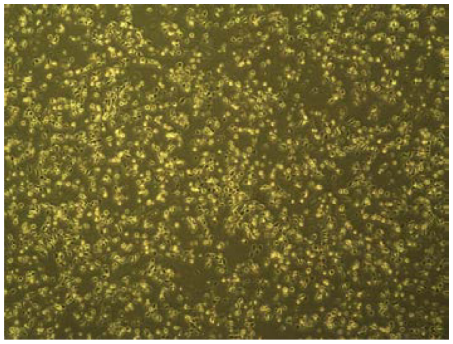
Konfluence > 85 %. Šajā posmā šūnas ir eksponētas testējamām ķimikālijām. Šūnu dzīvotspēja 95 %.
Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



Konfluence > 95 %. Šūnas ir blīvi saspiedušās un sāk pāraugt. Šūnu dzīvotspēja 95 %.
Klasifikācija "citotoksicitātes nav".



Šūnu dzīvotspēja 25 %. Šūnas atdalās, un saskare starp šūnām samazinās. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija "citotoksicitāte".



Šūnu dzīvotspēja 5 %. Šūnas ir pavisam atdalījušās, un nesaskaras. Šūnas ir noapaļotas. Klasifikācija "citotoksicitāte".

▼M8

B.67. ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU *IN VITRO* TESTI AR TIMIDĪNKINĀZES GĒNU

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO Testēšanas vadlīnijā (*TG*) Nr. 490 (2016) aprakstītajam. Testēšanas metodes tiek pastāvīgi pārskatītas zinātnes sasniegumu, normatīvo prasību un dzīvnieku labturības apsvērumu gaismā. Peļu limfomas ķīmiskā analīze (MLA) un TK6 tests ar timidīnkināzes (TK) lokusu sākotnēji bija iekļauti B.17. testēšanas metodē. Vēlāk Genotoksiskuma testēšanas starptautiskā darbsemināra (*IWGT*) MLA ekspertu darbgrupa sagatavoja starptautiski saskaņotus ieteikumus par MLA ķīmiskās analīzes pieņemamības kritērijiem un datu interpretēšanu (1)(2)(3)(4)(5), un minētie ieteikumi ir iestrādāti šajā jaunajā, B.67. testēšanas metodē. Šī testēšanas metode ir paredzēta MLA un – tā kā tajā izmanto TK lokusu – arī TK6 testam. MLA jau iepriekš plaši izmantota normatīvām vajadzībām, bet TK6 lietots daudz retāk. Lai gan abu šūnu līniju beigupunkti ir līdzīgi, tās nav savstarpēji aizstājamas, un normatīvajās programmās var būt pamatoti dota priekšroka vienas vai otras līnijas izmantošanai kādai konkrētai normatīvai vajadzībai. Piemēram, MLA validācijā pierādījās, ka tā ir piemērota, lai detektētu ne tikai gēnu mutāciju, bet arī testējamās ķimikālijas spēju inducēt strukturālus hromosomu bojājumus. Šī testēšanas metode pieder pie ģenētiski toksikoloģiskās testēšanas metožu sērijas. ESAO nesen izstrādājusi dokumentu, kas īsi informē par ģenētiski toksikoloģisko testēšanu un sniedz pārskatu par neseniem ESAO ģenētiskā toksiskuma testēšanas vadlīniju grozījumiem (6).

2. Šā zīdītāju šūnu gēnu mutāciju *in vitro* testa nolūks ir detektēt ķimikāliju izraisītas gēnu mutācijas. Ar šajos testos izmantotajām šūnu līnijām mēra turpvērstas reportiergēnu mutācijas endogēniskajā timidīnkināzes gēnā (cilvēka šūnu *TK* un grauzēju šūnu *Tk*; šajā testēšanas metodē abi dēvēti par *TK*). Šo testēšanas metodi paredzēts izmantot ar divām šūnu līnijām, proti, L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C peļu limfomas šūnu līniju (vispārīgais nosaukums L5178Y) un TK6 cilvēka limfoblastoīdo šūnu līniju (vispārīgais nosaukums TK6). Kaut arī abas šūnu līnijas atšķiras izcelsmes, šūnu augšanas, p53 statusa un citādā ziņā, *TK* gēnu mutācijas testēšanu abu tipu šūnās ir iespējams veikt līdzīgā veidā, kas aprakstīts šajā testēšanas metodē.

3. Timidīnkināzes gēna autosomālā un heterozigotiskā iedaba ļauj detektēt dzīvotspējīgas kolonijas, kuru šūnās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ timidīnkināzes ferments vairs neizpaužas. Šo neesību var radīt *TK* gēnu ietekmējoši ģenētiski notikumi, un to vidū var būt kā gēnu mutācijas (punktveida mutācijas, nolasīšanas fāzes nobīdes mutācijas, sīkas delēcijas u. c.), tā hromosomāli notikumi (plašas delēcijas, strukturālas hromosomu aberācijas un mitotiskā rekombinācija). Pēdējie minētie notikumi izpaužas kā heterozigotitātes zudums, un cilvēka kanceroģenēzē tā ir parasta ģenētiska tumorsupresorgēnu pārmaiņa. Teorētiski ar MLA ir iespējams detektēt pilnīgu *TK* nesējas hromosomas zudumu dalīšanās vārpstas traucējumu un/vai mitotiskas neizšķiršanās ietekmē. Citoģenētiskā un molekulārā analīze, izmantotas kopā, skaidri parāda, ka daļa MLA TK mutantu ir neizšķiršanās rezultāts. Tomēr pierādījumu svars rāda, ka, piemērojot citotoksicitātes standartkritērijus (aprakstīti šajā testēšanas metodē), ar *TK* gēnu mutācijas testiem nav iespējams uzticami detektēt aneigēnus, un tāpēc šie testi aneigēnu detektēšanai nav piemēroti (7)(8)(9).

▼M8

4. *TK* gēnu mutācijas testos tiek ģenerēti divām atšķirīgām fenotipiskajām klasēm piederīgi *TK* mutanti: normāli augošie mutanti, kas aug tikpat ātri kā TK heterozigotiskās šūnas, un lēnaudzīgie mutanti, kuru augšanu raksturo pagarināts dubultošanās laiks. Normāli augošie un lēnaudzīgie mutanti MLA tiek saukti attiecīgi par lielo un mazo koloniju mutantiem, bet TK6 – par agrīno un vēlīno koloniju mutantiem. Lielo un mazo koloniju MLA mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības ir sīki izpētītas (8)(10)(11)(12)(13). Visnotaļ sīki pētītas arī agrīno un vēlīno TK6 mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības (14)(15)(16)(17). Abu šūnu tipu lēnaudzīgos mutantus ietekmējuši ģenētiski bojājumi, kuri izpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā un kuru rezultāts ir ilgāks dubultošanās laiks un vēlīno jeb mazo koloniju veidošanās (18). Lēnaudzīgo mutantu inducēšana tiek saistīta ar ķimikālijām, kas inducē plašas strukturālas izmaiņas hromosomālā līmenī. Šūnas, kuru bojājumi neizpaužas ar augšanu regulējošu varbūtīgu gēnu vai gēniem *TK* lokusa tuvumā, aug līdzīgā ātrumā kā vecākšūnas un kļūst par normāli augošiem mutantiem. Tādu mutantu inducēšana, kuri aug galvenokārt normāli, tiek saistīta ar ķimikālijām, kas iedarbojas galvenokārt kā punktveida mutagēni. Tāpēc ir svarīgi pieskaitīt gan lēnaudzīgos, gan normāli augošos mutantus, lai tādā veidā apzinātu tos visus un iegūtu priekšstatu par testējamās ķimikālijas inducēto bojājumu tipu vai tipiem (mutagēni / klastogēni) (10)(12)(18)(19).

5. Šis testēšanas metodes apraksts strukturēts tā, lai dotu vispārīgu informāciju, kas attiecas gan uz MLA, gan uz TK6, un pēc tam sīkākas vadlīnijas par katru atsevišķo testu.

6. Izmantotās definīcijas sniegtas 1. pielikumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

7. *In vitro* testos metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēnisks avots. Eksogēniskā metaboliskās aktivācijas sistēma *in vivo* apstākļus atdarina nepilnīgi.

8. Būtu jāraugās, lai nerodas tādi apstākļi (proti, varbūtēja mijiedarbība ar testa sistēmu), kas noved pie artefaktuāli pozitīviem rezultātiem, kurus nerada testējamās ķimikālijas un šūnas ģenētiskā materiāla mijiedarbība; pie tādiem apstākļiem pieder arī pH vai osmolalitātes pārmaiņas, mijiedarbība ar barotnes sastāvdaļām (20)(21) vai pārāk augsti citotoksicitātes līmeņi (22)(23)(24). MLA un TK6 testā par pārāk augstiem uzskata līmeņus, kas pārsniedz 28. punktā definētos ieteicamos augšējos citotoksicitātes līmeņus. Turklāt jāatzīmē, ka testējamās vielas, kuras ir timidīna analogi vai iedarbojas kā timidīna analogi, šūnu apstrādes laikā var izraisīt spontānu fona mutantu selektīvu augšanu un tādējādi palielināt mutantu biežumu, tāpēc šo vielu adekvātas izvērtēšanas labad jāizmanto papildu testēšanas metodes (25).

9. Attiecībā uz nanomateriāliem, kas iegūti ar inženierijas paņēmieniem, šo testēšanas metodi var būt vajadzīgs pielāgot, taču tas šeit nav konkrēti aprakstīts.

10. Pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādā veidā tā varētu dot minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, šāda apsvēršana nav vajadzīga.

▼M8

11. Mutantšūnas, kurās pēc mutācijas no $TK^{+/-}$ uz $TK^{-/-}$ vairs neizpaužas timidīnkināzes fermentatīvā darbība, ir rezistentas pret pirimidīna analoga trifluortimidīna (TFT) citostatisko iedarbību. *TK* standartšūnas ir jutīgas pret TFT, kas izraisa šūnu metabolisma inhibēšanu un aptur šūnu turpmāko dalīšanos. Tātad mutantšūnas TFT klātbūtnē spēj proliferēt un veidot redzamas kolonijas, turpretī TK fermentu saturošās šūnas to nespēj.

TESTA PRINCIPS

12. Šūnas, kas ir suspensijā, uz piemērotu laiku (sk. 33. punktu) gan ar eksogēnisku metaboliskas aktivācijas avotu, gan bez tā (sk. 19. punktu) eksponē testējamajai ķimikālijai un pēc tam subkultivē, lai noteiktu citotoksicitāti un lai pirms mutantu atlasīšanas varētu notikt fenotipiskā ekspresija. Citotoksicitāti nosaka pēc relatīvā kopējā pieauguma (RTG; sk. 25. punktu) MLA gadījumā un pēc relatīvās izdzīvotības (RS; sk. 26. punktu) TK6 gadījumā. Lai inducēto mutāciju fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, apstrādātās kultūras barotnē tur pietiekami ilgu laiku, kas ir raksturīgs katram izvēlētajam šūnu tipam (sk. 37. punktu). Kad notikusi fenotipiskā ekspresija, nosaka mutantu biežumu, noteiktu skaitu šūnu izsējot barotnē, kas satur selektīvo aģentu, ar kuru detektē mutantkolonijas, un barotnē bez selektīvā aģenta, pēc kuras nosaka klonēšanās efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc piemērota inkubēšanas laika kolonijas saskaita. Mutantu biežumu aprēķina pēc mutantkoloniju skaita, ko koriģē ar klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī.

METODES APRAKSTS

Preparāti

Šūnas

13. Attiecībā uz MLA: tā kā MLA ir izstrādāta un aprakstīta, izmantojot L5178Y šūnu $TK^{+/-}$ -3.7.2C apakšlīniju, jāņem šī konkrētā apakšlīnija. L5178Y šūnu līnija tikusi atvasināta no DBA-2 peļu timīnās limfomas, kas inducēta ar metilholantrēnu (26). *Clive* un līdzstrādnieki L5178Y šūnas (*Clive* klasificētas kā $TK^{+/+}$ -3) apstrādāja ar etilmetāna sulfonātu un izolēja $TK^{-/-}$ (klasificēta kā $TK^{-/-}$ -3.7) klonu, par selektīvo aģentu izmantojot bromdeoksiuridīnu. No $TK^{-/-}$ tika izolēts un izmantošanai MLA aprakstīts spontāns $TK^{+/-}$ klons (klasificēts kā $TK^{+/-}$ -3.7.2.) un apakšklons (klasificēts kā $TK^{+/-}$-3.7.2C) (27). Šīs šūnu līnijas kariotips tika publicēts (28)(29)(30)(31). Tā modālais hromosomu skaits ir 40. Ir viena metacentriska hromosoma (t12 13), kas būtu jāpieskaita kā viena hromosoma. Peļu *TK* lokuss atrodas 11. hromosomas distālajā galā. L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C šūnu līnijai mutācijas ir abās p53 alēlēs, un tā rada p53 mutantproteīnu (32)(33). Visdrīzāk $TK^{+/-}$-3.7.2C šūnu līnijas p53 statuss ir tas, kas nosaka, cik labi tests spēj detektēt plašus bojājumus (17).

14. Attiecībā uz TK6: TK6 ir cilvēka limfoblastoīdo šūnu līnija. Vecākšūnu līnija ir *Epstein–Barr* vīrusa transformēta šūnu līnija, WI-L2, sākotnēji iegūta no piecgadīga zēna, kurš sirga ar pārmantotu sferocitozi. Pirmo izolēto klonu, HH4, mutagenizēja ar ICR191, un rezultātā ieguva *TK* heterozigotisku šūnu līniju, TK6 (34). TK6 šūnas ir gandrīz diploīdas, un reprezentatīvais kariotips ir 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Cilvēka *TK* lokuss atrodas 17. hromosomas garajā plecā. TK6 ir p53 ziņā kompetenta šūnu līnija, jo tai abās alēlēs ir savvaļas tipa p53 sekvence un ekspresijā – tikai savvaļas tipa p53 proteīns (53).

▼M8

15. Kad testēšanas laboratorija veic izejkultūras veidošanu vai papildināšanu, gan MLA, gan TK6 gadījumā ieteicams nodrošināt, ka nav kontaminācijas ar *Mycoplasma*, noteikt šūnu kariotipu vai iekrāsot *TK* lokusu nesošās hromosomas un pārbaudīt populāciju dubultošanās laikus. Jānosaka, kāds ir testēšanas laboratorijā izmantoto šūnu normālais šūnas cikla ilgums, un tam jāsakrīt ar publicētajiem šūnu raksturlielumiem (16)(19)(37). Šī izejkultūra jāglabā -150 °C vai zemākā temperatūrā, un no tās gatavojamas visas šūnu darbkultūras.

16. Pirms ar krioprezervācijas palīdzību lielā skaitā veidot darbkultūras vai vienkārši pirms kultūras izmantošanas eksperimentā tā var būt jāattīra no iepriekš pastāvošajām mutantšūnām [, izņemot tad, ja šķīdinātāja kontrolē mutantu biežums (MF) jau tolaik ir pieņemamā diapazonā (attiecībā uz MLA sk. 2. tabulu)]. Tas darāms, izmantojot metotreksātu (*aminopterīnu*), lai šūnas, kurās TK neizpaužas, tiktu negatīvi atlasītas, un pievienojot kultūrai timidīnu, hipoksantīnu un glicīnu (L5178Y) vai 2'-deoksicitidīnu (TK6), lai tādā veidā nodrošinātu TK ziņā kompetento šūnu optimālu augšanu (19)(38)(39), TK6 gadījumā (40). Vispārīgus ieteikumus par labu praksi šūnu kultūru uzturēšanā, kā arī ieteikumus konkrēti par L5178Y un TK6 šūnām skatīt (19)(31)(37)(39)(41). Laboratorijām, kam šūnu izejkultūras vajadzīgas MLA vai TK6 iniciēšanas nolūkiem vai kam vajadzīgas jaunas šūnu izejkultūras, ir pieejams labi aprakstītu šūnu repozitorijs (37).

Barotne un kultivēšanas apstākļi

17. Abos testos kultūru uzturēšanai jāizmanto attiecīgas barotnes un attiecīgi inkubācijas apstākļi (piem., kultivēšanas trauki, mitrināta atmosfēra ar CO_2 koncentrāciju 5 %, inkubācijas temperatūra 37 °C). Šūnu kultūras vienmēr jātur tādos apstākļos, lai būtu nodrošināts, ka augšana notiek eksponenciālā fāzē. Īpaši svarīgi ir izraudzīties tādu barotni un tādus kultivēšanas apstākļus, kuri nodrošina šūnu optimālu augšanu ekspresijas periodā un gan mutantšūnu, gan nemutējušo šūnu klonēšanos. Gan MLA, gan TK6 gadījumā svarīgi ir arī tas, lai kultivēšanas apstākļi nodrošinātu optimālu augšanu kā lielo/agrīno, tā mazo/vēlīno koloniju TK mutantiem. Vairāk par kultivēšanu, arī par vajadzību pienācīgi termiski inaktivēt zirgu serumu, ja mutantu atlasē tiek izmantota RPMI barotne, skatīt (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Kultūru sagatavošana

18. No izejkultūrām tiek pavairotas šūnas, tās iesētas kultūras barotnē tādā blīvumā, lai apstrādes periodā un ekspresijas periodā kultūras suspensijās joprojām augtu eksponenciāli.

Metaboliskā aktivācija

19. Ja strādā ar L5178Y un TK6 šūnām – to endogēniskā metaboliskā kapacitāte nav pietiekama –, jāizmanto eksogēniskas metaboliskās aktivācijas sistēmas. Visplašāk izmantotā sistēma, kuru iesaka izmantot pēc noklusējuma, ja vien nav pamata izmantot citu, ir ar kofaktoru papildināta postmitohondriālā frakcija (S9) no grauzēju (parasti žurku) aknām, kas apstrādātas ar fermentus inducējošām vielām, piemēram, Aroclor 1254 (43)(44)(45) vai fenobarbitālu kombinācijā ar β-naftoflavonu (46)(47)(48)(49)(50)(51). Pēdējā minētā

▼M8

kombinācija nav pretrunā ar Stokholmas Konvenciju par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem (52) un izrādījusies tikpat produktīva jauktas funkcijas oksidāžu inducētāja kā Aroclor 1254 (45)(46)(47)(48)(49). S9 frakciju parasti izmanto 1–2 % tilpumkoncentrācijā, bet galīgajā testa barotnē tilpumkoncentrāciju var palielināt līdz 10 %. Eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas vai metaboliskā inducētāja veida un koncentrācijas izvēli var ietekmēt testējamo ķimikāliju klase.

Testējamās ķimikālijas sagatavošana

20. Cietas testējamās ķimikālijas jāsagatavo attiecīgos šķīdinātājos un attiecīgā gadījumā pirms šūnu apstrādes jāatšķaida (sk. 21. punktu). Šķidras testējamās ķimikālijas var testa sistēmai pievienot tieši un/vai pirms testa sistēmas apstrādes atšķaidīt. Gāzveida vai gaistošas testējamās ķimikālijas jātestē pēc attiecīgām standarta protokolu modifikācijām, piemēram, apstrādi veicot hermētiski noslēgtos kultivēšanas traukos (53)(54)(55). Testējamās ķimikālijas preparāti jāpagatavo tieši pirms apstrādes, ja vien dati par stabilitāti neliecina, ka tos var glabāt.

TESTĒŠANAS NOSACĪJUMI

Šķīdinātāji

21. Šķīdinātājs jāizvēlas tā, lai optimizētu testējamās ķimikālijas šķīdību, šķīdinātājam negatīvi neietekmējot testa norisi, piemēram, nemainot šūnu augšanu, neskarot testējamās ķimikālijas integritāti, nereaģējot ar kultivēšanas traukiem, nepasliktinot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Ja vien iespējams, ieteicams vispirms apsvērt, vai neizmantot šķīdinātāju (vai kultūras barotni) uz ūdens bāzes. Plaši atzīti šķīdinātāji ir ūdens vai dimetilsulfoksīds. Galīgajā apstrādes barotnē organisko šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai parasti nevajadzētu pārsniegt 1 %, bet uz (sālsūdens vai saldūdens) bāzes pagatavotu šķīdinātāju tilpumkoncentrācijai – 10 %. Ja tiek izmantoti ne tik plaši atzīti šķīdinātāji (piem., etanols vai acetons), to izmantošana jāpamato ar datiem, kas apliecina to saderību ar testējamajām ķimikālijām, izmantoto testa sistēmu un ģenētiskās toksicitātes neesību izmantotajā koncentrācijā. Ja šādu apliecinošu datu nav, svarīgi ir izmantot arī neapstrādātas kontroles (sk. definīciju 1. papildinājumā), lai ar tām pierādītu, ka izraudzītajam šķīdinātājam nav deletējošas vai mutagēniskas ietekmes.

CITOTOKSICITĀTES MĒRĪŠANA UN APSTRĀDES KONCENTRĀCIJU IZRAUDZĪŠANĀS

22. Nosakot augstāko testējamās ķimikālijas koncentrāciju, neizraugās koncentrācijas, kas spēj izraisīt tādas artefaktuāli pozitīvas atbildreakcijas kā pārmērīga citotoksicitāte (sk. 28. punktu), izgulsnēšanās (sk. 29. punktu) kultūras barotnē vai manāmas pH vai osmolalitātes pārmaiņas (sk. 8. punktu). Lai nepieļautu artefaktuāli pozitīvus rezultātus un uzturētu pienācīgus kultivēšanas apstākļus gadījumā, ja testējamā ķimikālija pievienošanas brīdī manāmi maina barotnes pH, to var koriģēt, galīgajā apstrādes barotnē pievienojot buferšķīdumu.

23. Koncentrācijas izraugās pēc citotoksicitātes un citiem apsvērumiem (sk. 27.–30. punktu). Kaut arī citotoksicitātes izvērtēšana sākotnējā testā var noderēt, lai sekmīgāk noteiktu galvenajā eksperimentā izmantojamās koncentrācijas, sākotnējais tests nav jāveic obligāti. Pat ja citotoksicitāte izvērtēta jau no sākuma, galvenajā eksperimentā tā joprojām jānosaka katrai kultūrai. Ja eksperimentā nosaka diapazonu, būtu jāaptver plašs koncentrāciju spektrs un eksperiments jābeidz vai nu pirmajā dienā pēc apstrādes, vai (ja izmantotās koncentrācijas izrādās piemērotas) tas jāturpina divu dienu ilgajā ekspresijas laikā līdz mutantu atlasei.

▼**M8**

24. Citotoksicitāte jānosaka katrā individuālā testa kultūrā un kontrolkultūrā: MLA (2) un TK6 (15) atbilstošās metodes ir definētas ar starptautiski saskaņotu praksi.

25. Abās (agara un mikroiedobju) MLA versijās citotoksicitāte jāizvērtē, izmantojot relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), kuru 1975. gadā sākotnēji definējuši *Clive* un *Spektor* (2). Tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) šūnu apstrādes laikā, ekspresijas laiku un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE: testa kultūra / šķīdinātāja kontrole) mutantu atlasīšanas brīdī (2). Jāatzīmē, ka ar RSG ir ņemts vērā arī apstrādes laikā novērojamais šūnu zudums testa kultūrā (sk. formulas 2. papildinājumā).

26. Attiecībā uz TK6 citotoksicitāte jāizvērtē pēc relatīvās izdzīvotības (RS), proti, pēc to šūnu klonēšanās efektivitātes (CE), kuras tūlīt pēc apstrādes uzsētas uz platēm, CE koriģējot atkarībā no šūnu zuduma apstrādes laikā salīdzinājumā ar šūnu skaitu negatīvajā kontrolē (kurā izdzīvotību pieņem par 100 %), sk. formulu 2. papildinājumā.

27. Jāizvērtē vismaz četras testējamās koncentrācijas (nerēķinot šķīdinātāja un pozitīvās kontroles), kas atbilst pieņemamības kritērijiem (attiecīga citotoksicitāte, šūnu skaits u. c.). Lai gan ir ieteicams izmantot duplikatīvas kultūras, ar katru testējamo koncentrāciju var izmantot vai nu replikatīvas, vai atsevišķas apstrādātas kultūras. Ar replikatīvajām kultūrām pie kādas konkrētas koncentrācijas iegūtie rezultāti pārskatā būtu jāatspoguļo atsevišķi, bet datu analīzes vajadzībām tos drīkst apvienot (55). Attiecībā uz testējamajām ķimikālijām, kas uzrāda nelielu vai neuzrāda nekādu citotoksicitāti, parasti noderēs divkāršotas līdz trīskāršotas koncentrācijas intervāli. Ja citotoksicitāte ir novērojama, koncentrācijas jāizraugās tā, lai citotoksitātes diapazons aptvertu gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir tāda, kāda aprakstīta 28. punktā, gan koncentrācijas, pie kurām citotoksicitāte ir vidēji liela vai maza, vai arī tās nav. Daudzām testējamajām ķimikālijām ir novērojama stāva koncentrācijatkarīgās atbildreakcijas līkne, un, lai aptvertu visu citotoksicitātes diapazonu vai lai detalizēti izpētītu devas un atbildreakcijas sakarību, var būt nepieciešams izmantot koncentrācijas ar tuvākiem intervāliem un vairāk nekā četras koncentrācijas, jo īpaši situācijās, kur eksperiments jāatkārto (sk. 70. punktu). Vairāk nekā 4 koncentrācijas var būt īpaši vajadzīgas, ja jāizmanto atsevišķas kultūras.

28. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksicitātes, ar augstāko koncentrāciju MLA gadījumā būtu jācenšas panākt 20 līdz 10 % lielu RTG, bet TK6 gadījumā – 20 līdz 10 % lielu RS (67. punkts).

29. Mazšķīstošu testējamo ķimikāliju gadījumā, kuras pie koncentrācijām, kas zemākas par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, nav citotoksiskas, pie augstākās analizētās koncentrācijas pēc apstrādes ar testējamo ķimikāliju jārodas ar neapbruņotu aci vai ar invertēto mikroskopu redzamai duļķainībai vai nogulsnēm. Pat ja citotoksicitāte novērojama pie koncentrācijas, kas augstāka par zemāko nešķīstošās frakcijas koncentrāciju, ieteicams testēt tikai vienu koncentrāciju, kas rada acīmredzamu duļķainību vai nogulsnes, jo nogulsnes var artefaktiski ietekmēt rezultātus. Tā kā MLA un TK6 tiek izmantotas suspensijas kultūras, īpaši būtu jāraugās, lai nogulsnes netraucētu testa izdarīšanā. Turklāt var būt lietderīgi pirms eksperimenta noteikt šķīdību kultūras barotnē.

▼M8

30. Ja nogulsnes vai ierobežojoša citotoksicitāte netiek novēroti, augstākajai testējamajai koncentrācijai jāatbilst 10 mM, 2 mg/ml vai 2 µl/ml atkarībā no tā, kura ir zemāka (57)(58). Ja testējamās ķimikālijas sastāvs nav noteikts, piem., tā ir viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, tā ir komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls [t. i., ķīmiska viela, kuras sastāvs nav zināms vai ir mainīgs (*UVCB*)], vidiski ekstrakti u. tml., gadījumos, kur netiek novērota pietiekama citotoksicitāte, augstākā koncentrācija var būt jāpalielina (piem., līdz 5 mg/ml), lai būtu panākta augstāka katras sastāvdaļas koncentrācija. Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59).

Kontroles

31. Ikvienā eksperimentā jāiekļauj paralēlas negatīvās kontroles (sk. 21. punktu), proti, tikai šķīdinātāju apstrādes barotnē, ar ko rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādātajām kultūrām.

32. Paralēlās pozitīvās kontroles ir nepieciešamas, lai pierādītu laboratorijas spēju identificēt mutagēnus izmantotā testēšanas protokola apstākļos, (attiecīgā gadījumā) eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un to, ka tiek adekvāti detektēti kā mazo/vēlīno, tā lielo/agrīno koloniju TK mutanti. Pozitīvo kontroļu piemēri sniegti zemāk 1. tabulā. Var izmantot alternatīvas pozitīvās kontrolvielas, ja tas ir pamatoti. Tā kā zīdītāju šūnu ģenētiskās toksicitātes *in vitro* testi ir pietiekami standartizēti īslaicīgām (3–4 stundu ilgām) apstrādēm, kas tiek veiktas paralēli ar tikpat ilgu metabolisko aktivāciju un bez tās, ir iespēja pozitīvās kontroles izmantot tik vien kā attiecībā uz mutagēnu, kam nepieciešama metaboliskā aktivācija. Šajā gadījumā viena vienīga pozitīva kontroles atbildreakcija apliecinās gan metaboliskās aktivācijas sistēmas darbību, gan testa sistēmas reaģētspēju. Ilglaicīgas (piem., 24 stundas bez S9) apstrādes gadījumā tomēr vajadzīga atsevišķa pozitīvā kontrole, jo apstrādes ilgums atšķirsies no tā, ko izmanto testā ar metabolisko aktivāciju. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību, katra pozitīvā kontrole būtu jāizmanto ar vienu vai vairākām tādām koncentrācijām, ar kurām gaidāma reproducējama un detektējama palielināšanās salīdzinājumā ar fonu, turklāt atbildreakciju nedrīkstētu kompromitēt citotoksicitāte, kas pārsniedz šai testēšanas metodei specificētās robežas (sk. 28. punktu).

1. tabula

References vielas, ko ieteicams izmantot laboratorijas kompetences novērtēšanai un pozitīvo kontroļu izraudzīšanās vajadzībām

Kategorija	Viela	*CAS* Nr.
1. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija nav vajadzīga		
	Metilmetānsulfonāts	66-27-3
	Mitomicīns C	50-07-7
	4-Nitrohinolīn-*N*-oksīds	56-57-5
2. Mutagēni, kuriem metaboliskā aktivācija ir vajadzīga		
	Benz(a)pirēns	50-32-8
	Ciklofosfamīds (monohidrāts)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenzantracēns	57-97-6
	3-Metilholantrēns	56-49-5

▼M8

PROCEDŪRA

Apstrāde ar testējamo ķimikāliju

33. Proliferējošas šūnas ar testējamo ķimikāliju apstrādā gan metaboliskās aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ekspozīcijai jāilgst attiecīgu laiku (parasti pietiek ar 3–4 stundām). Tomēr jāpiebilst, ka attiecībā uz cilvēkiem paredzētajām zālēm šīs prasības var būt citādas (59). MLA gadījumā, ja īslaicīga apstrāde dod negatīvus rezultātus un ir informācija, kas liecina, ka var būt vajadzīga ilgāka apstrāde [piem., nukleozīda analogiem, mazšķīstošām ķimikālijām (5)(59)], jāapsver testa izdarīšana, izmantojot ilglaicīgāku apstrādi, piem., 24 stundas bez S9.

34. Minimālais šūnu skaits, ko izmanto katrai testa kultūrai (gan kontrolkultūrai, gan apstrādātai kultūrai), katrā testa posmā jābalsta uz spontāno mutantu biežumu. Vispārīgs princips ir šūnas apstrādāt un pasāžām ņemt tādā skaitā, lai visās testa fāzēs (apstrādē, fenotipiskajā ekspresijā un mutantu atlasē) katrā eksperimentālajā kultūrā saglabātos vismaz 10, bet ideālā gadījumā 100 spontāno mutantu (56).

35. MLA gadījumā ieteicamais pieņemamais spontāno mutantu biežums ir $35–140 \times 10^{-6}$ (agara versijā) un $50–170 \times 10^{-6}$ (mikroiedobju versijā) (sk. 2. tabulu). Lai katrā testa kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 un ideāli 100 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 6×10^6 šūnu. Šāda skaita apstrāde un pietiekama šūnu skaita uzturēšana ekspresijas un mutantu atlasei vajadzīgās klonēšanas laikā visās eksperimenta fāzēs nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (izmērīta ar 10 % RGT) (19)(38)(39).

36. TK6 gadījumā spontāno mutantu biežums parasti ir $2–10 \times 10^{-6}$. Lai katrā kultūrā pēc apstrādes paliktu vismaz 10 spontāno mutantu, ir jāapstrādā vismaz 20×10^6 šūnu. Šāda šūnu skaita apstrāde nodrošina pietiekami daudz (10 vai vairāk) spontāno mutantu, arī kultūrās, kas apstrādātas ar koncentrācijām, kuras rada 90 % citotoksicitāti (10 % RS). Turklāt pietiekamā skaitā jābūt arī šūnām, ko kultivē ekspresijas periodā un mutantu atlasīšanas nolūkā uzsēj uz platēm (60).

Fenotipiskās ekspresijas laiks un citotoksicitātes un mutantu biežuma mērīšana

37. Lai jauninducēto mutantu fenotipiskā ekspresija varētu izpausties gandrīz optimāli, pēc apstrādes šūnas vēl kultivē noteiktu laiku, kas ir katrai šūnu līnijai specifisks. MLA gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ilgst 2 dienas. TK6 gadījumā fenotipiskās ekspresijas periods ir 3–4 dienas. Ja veic 24 stundu ilgu apstrādi, ekspresijas periodu sāk skaitīt no apstrādes beigu brīža.

38. Fenotipiskās ekspresijas perioda laikā šūnas katru dienu tiek saskaitītas. MLA gadījumā šūnu skaitīšanas rezultātu izmanto, lai aprēķinātu dienišķo suspensijas pieaugumu (SG). Kad beidzies 2 dienu ilgais ekspresijas periods, barotnē ar selektīvo aģentu un bez tā šūnas tiek suspendētas, lai noteiktu attiecīgi mutantu skaitu (selekcijas plates) un klonēšanās efektivitāti (dzīvotspējas plates). Ir divas vienādi pieņemamas metodes, ar kurām MLA tiek klonēti atlasīšanai vajadzīgie mutanti: vienā metodē izmanto mīksto agaru, bet otrā – šķidru barotni 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs (19)(38)(39). TK6 gadījumā klonēšana notiek, izmantojot šķidras barotnes un 96 iedobju mikrotitrēšanas plates (16).

▼M8

39. Vienīgais ieteicamais selektīvais aģents TK mutantiem ir trifluortimidīns (TFT).

40. MLA gadījumā agara platēm un mikroiedobju platēm skaitīšanu veic pēc 10–12 dienu ilgas inkubācijas. TK6 gadījumā agrīnos mutantus nosaka, kolonijas uz mikroiedobju platēm pieskaitot pēc 10–14 dienām. Lai parādītos lēnaudzīgie (vēlīnie) TK6 mutanti, pēc agrīno mutantu pieskaitīšanas šūnām no jauna jāpievieno barotne un TFT, un tad plates jāinkubē vēl 7–10 dienas (62). Vairāk par lēnaudzīgo un normāli augošo TK mutantu pieskaitīšanu skatīt 42. un 44. punktā.

41. Attiecīgās aprēķina formulas abiem testiem, arī abām MLA (agara un mikroiedobju) metodēm skatīt 2. papildinājumā. Pēc MLA agara metodes pieskaita kolonijas, atbilstoši klonēšanās efektivitātei koriģē mutantu koloniju skaitu un tad aprēķina MF. MLA un TK6 mikroiedobju versijā klonēšanās efektivitāti gan selekcijas platēm, gan klonēšanās efektivitātes platēm nosaka pēc t. s. Puasona sadalījuma (63). MF aprēķina, vadoties pēc šīm divām klonēšanās efektivitātes vērtībām.

Mutantkoloniju raksturošana

42. MLA gadījumā, ja testējamā ķimikālija ir pozitīva (sk. 62.–63. punktu), koloniju lielums vai augšana jāraksturo vismaz vienā no testa kultūrām (parasti pie augstākās pieņemamās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Ja testējamā ķimikālija ir negatīva (sk. 64. punktu), mutantkoloniju raksturošana jāveic negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Pēc MLA mikroiedobju metodes mazo koloniju mutantus definē kā tādus, kuri klāj mazāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra, bet lielo koloniju mutantus – kā tādus, kuri klāj vairāk nekā 25 % no iedobes platības, mērot pēc diametra. Pēc agara metodes mutantkolonijas skaita un to lielumu nosaka automātiski, izmantojot koloniju skaitītāju. Koloniju lieluma noteikšanā iespējamās pieejas sīkāk aprakstītas literatūrā (19)(38)(40). Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti.

43. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā lielo, tā mazo koloniju mutanti. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).

44. TK6: normāli augošos un lēnaudzīgos mutantus diferencē pēc inkubācijas laika atšķirības (sk. 40. punktu). TK6 gadījumā parasti saskaita gan agrīnos, gan vēlīnos mutantus visās kultūrās, arī negatīvajā un pozitīvajā kontrolē. Koloniju raksturošana negatīvajā un pozitīvajā kontrolē vajadzīga tādēļ, lai pierādītu, ka pētījums izdarīts adekvāti. Testējamo ķimikāliju nevar noteikt par negatīvu, ja pozitīvajā kontrolē nav adekvāti detektēti kā agrīnie, tā vēlīnie mutanti. Koloniju raksturošanu var izmantot, lai sniegtu vispārīgu informāciju par testējamās ķimikālijas spēju izraisīt punktveida mutācijas un/vai hromosomālus notikumus (4. punkts).

▼M8

Laboratorijas kompetence

45. Lai pirms testa pastāvīgas izmantošanas demonstrētu pietiekamu vajadzīgo pieredzi, laboratorijai jābūt veikušai eksperimentu sēriju ar pozitīvās kontroles references vielām, kam ir dažādi iedarbības mehānismi (tās izraugās no 1. tabulas saraksta un vismaz vienai no tām aktīvai jābūt ar metabolisku aktivāciju un vienai — bez tās), un ar dažādām negatīvajām kontrolēm (neapstrādātām kultūrām un dažādiem šķīdinātājiem/nesējiem). Šo pozitīvo un negatīvo kontroļu atbildreakcijām jāsaskan ar literatūras datiem. Šī prasība neattiecas uz laboratorijām, kurām ir pieredze, t. i., kuru rīcībā ir vēsturisko datu bāze, kas aprakstīta 47.–50. punktā. MLA gadījumā pozitīvās un negatīvās kontroles vērtībām jābūt saskaņā ar *IWGT* ieteikumiem (sk. 2. tabulu).

46. Lai varētu pierādīt, ka laboratorija ir kompetenta detektēt mutagēniskas ķimikālijas, noteikt metaboliskās aktivācijas sistēmas efektivitāti un pierādīt, ka šūnu augšanas apstākļi apstrādes laikā, fenotipiskā ekspresija un mutantu atlase, kā arī skaitīšanas procedūras atbilst vajadzīgajam, pozitīvas kontroles vielu (sk. 1. tabulu) izlase jāpēta gan pie īslaicīgas un ilglaicīgas (ja izmanto) apstrādes bez metaboliskas aktivācijas, gan pie īslaicīgas apstrādes metaboliskas aktivācijas apstākļos. Lai varētu pierādīt testa sistēmas jutību un dinamisko diapazonu, jāizraugās tāds izlases ķimikāliju koncentrāciju diapazons, kurā palielinājumi virs fona līmeņa būs reproducējami un koncentrācijatkarīgi.

Vēsturisko kontroļu dati

47. Laboratorijai jānosaka:

— vēsturisks pozitīvo kontroļu diapazons un sadalījums,

— vēsturisks negatīvo (neapstrādātu, ar šķīdinātāju) kontroļu diapazons un sadalījums.

48. Pirmoreiz iegūstot datus par vēsturisko negatīvo kontroļu sadalījumu, paralēlajām negatīvajām kontrolēm jāatbilst publicētajiem datiem par negatīvajām kontrolēm. Kontroļu sadalījumam tiekot papildinātam ar jauniem eksperimentu datiem, paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt minētā sadalījuma 95 % kontrolrobežās (64)(65).

49. Laboratorijas vēsturiskā negatīvo kontroļu datubāze sākotnēji jāveido ar vismaz 10 eksperimentiem, bet vēlams, lai tajā būtu vismaz 20 eksperimenti, kas veikti salīdzināmos eksperimentēšanas apstākļos. Lai varētu noteikt, cik mainīgi ir laboratorijas pozitīvo un negatīvo kontroļu dati, un parādīt, ka laboratorijā šī metodika "tiek kontrolēta" (66), laboratorijām jāizmanto tādas kvalitātes kontroles metodes kā kontroldiagrammas (piem., C diagrammas vai X joslu diagrammas (65)). Papildu ieteikumi par vēsturisko datu izveidi un izmantošanu atrodami literatūrā (64).

50. Negatīvo kontroļu datiem vajadzētu būt mutantu biežumam atsevišķās vai, ieteicams, replikatīvajās kultūrās; sk. aprakstu 27. punktā. Paralēlajām negatīvajām kontrolēm ideālā gadījumā jābūt laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzes sadalījuma 95 % kontrolrobežās. Tādus negatīvo kontroļu datus, kas ir ārpus 95 % kontrolrobežas, iekļaušanai vēsturiskajā kontroļu sadalījumā var pieņemt tikai tad, ja šie dati nav pārmērīgi anomālas vērtības un ja ir pierādījumi, ka testa sistēma "tiek kontrolēta" (sk. 49. punktu) un nav gadījusies ne tehniska kļūme, ne cilvēka kļūda.

▼M8

51. Jebkādas izmaiņas eksperimenta protokolā jāapsver, ņemot vērā attiecīgo datu atbilstību laboratorijas esošajai vēsturisko kontroļu datubāzei. Būtisku neatbilstību gadījumā jāveido jauna vēsturisko kontroļu datubāze.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izklāsts

52. Datu izklāstā gan MLA, gan TK6 gadījumā jāiekļauj zemāk aprakstītie dati, kas vajadzīgi, lai aprēķinātu citotoksicitāti (attiecīgi RTG vai RS) un mutantu biežumu apstrādātajās un kontroles kultūrās.

53. MLA gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RSG, RTG, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un mutantkoloniju skaits (agara versijā) vai tukšo iedobju skaits (mikroiedobju versijā). Mutantu biežums (MF) jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz miljonu izdzīvojušo šūnu. Ja atbildreakcija ir pozitīva, vismaz pie vienas no testējamās ķimikālijas koncentrācijām (parasti pie augstākās pozitīvās koncentrācijas) un negatīvajā un pozitīvajā kontrolē jānorāda mazo un lielo koloniju MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF). Ja atbildreakcija ir negatīva, mazo un lielo koloniju MF jānorāda negatīvajā kontrolē un pozitīvajā kontrolē.

54. TK6 gadījumā jānorāda individuālu kultūru dati par RS, klonēšanās efektivitāti mutantu atlasīšanas brīdī un tukšo iedobju skaits attiecībā uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem. MF jāizteic ar mutantšūnu skaitu uz izdzīvojušo šūnu skaitu un jānorāda gan kopējais MF, gan agrīno un vēlīno mutantu MF (un/vai to īpatsvars kopējā MF).

Pieņemamības kritēriji

55. Lai varētu noteikt konkrētas ķimikālijas testēšanas koprezultātus, gan MLA, gan TK6 gadījumā jābūt izpildītiem šādiem kritērijiem:

— testēšana notikusi ar diviem eksperimentēšanas nosacījumiem (īslaicīga apstrāde ar metabolisko aktivāciju un bez tās, sk. 33. punktu), ja vien vienā no tiem rezultāti nav bijuši pozitīvi;

— pietiekams šūnu un koncentrāciju skaits ir analizēšanai derīgs (sk. 27. punktu un 34.–36. punktu);

— augstākās koncentrācijas izvēles kritēriji atbilst 28.–30. punktā aprakstītajiem.

Negatīvo un pozitīvo kontroļu pieņemamības kritēriji

56. *IWGT* izveidotā MLA ekspertu darbgrupa ir analizējusi lielu daudzumu MLA datu, un rezultātā ir panākta starptautiska vienprātība par konkrētiem MLA pieņemamības kritērijiem (1)(2)(3)(4)(5). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā MLA gadījumā nosakāma negatīvās un pozitīvās kontroles pieņemamība un izvērtējami individuālu vielu rezultāti. TK6 datubāze ir daudz mazāka un nav tikusi izvērtēta darbgrupā.

▼M8

57. MLA gadījumā ikviens eksperiments jāizvērtē to tāda viedokļa, vai neapstrādātā/šķīdinātāja kontrole atbilst *IWGT* izveidotās MLA darbgrupas noteiktajiem pieņemamības kritērijiem (sk. (4) un zemāk 2. tabulu) attiecībā uz: 1) MF (turklāt MLA agara un mikroiedobju versijās *IWGT* pieņemamie MF ir atšķirīgi); 2) klonēšanās efektivitāti (CE) mutantu atlasīšanas brīdī un 3) suspensijas pieaugumu (SG) šķīdinātāja kontrolē (formulas sk. 2. papildinājumā).

2. tabula

MLA pieņemamības kritēriji

Parametrs	Mīkstā agara metode	Mikroiedobju metode
Mutantu biežums	35–140 × 10^{-6}	50–170 × 10^{-6}
Klonēšanās efektivitāte	65–120 %	65–120 %
Suspensijas pieaugums	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)	8 līdz 32-kārtīgs (3–4 stundu apstrādē) 32 līdz 180-kārtīgs (24 stundu apstrādē, ja tādu veic)

58. MLA gadījumā ikviens tests jāizvērtē arī no tā viedokļa, vai pozitīvā kontrole (kontroles) atbilst vismaz vienam no šādiem diviem *IWGT* darbgrupas izstrādātiem pieņemamības kritērijiem:

— pozitīvajai kontrolei jāuzrāda absolūts kopējā MF palielinājums, t. i., palielinājums, kas pārsniedz vismaz 300 × 10^{-6} lielo spontāno fona MF [inducēto MF jeb IMF]. Vismaz 40 % no IMF jābūt mazo koloniju MF;

— pozitīvajā kontrolē mazo koloniju MF palielinājumam vismaz par 150 × 10^{-6} jāpārsniedz tas, kas ir paralēlajā neapstrādātajā/šķīdinātāja kontrolē (150 × 10^{-6} liels mazo koloniju IMF).

59. TK6 gadījumā tests ir pieņemams, ja paralēlā negatīvā kontrole tiek uzskatīta par pieņemamu iekļaušanai laboratorijas vēsturisko negatīvo kontroļu datubāzē saskaņā ar 48.–49. punktu. Turklāt paralēlajām pozitīvajām kontrolēm (sk. 32. punktu) jāinducē atbildreakcijas, kas atbilst tām, kuras ģenerētas vēsturiskajā pozitīvo kontroļu datubāzē iekļautajās kontrolēs, un jāizsaka statistiski ievērojams palielinājums salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli.

60. Abos testos pozitīvajā kontroles kultūrā novērotās citotoksicitātes augšējai robežvērtībai jābūt tādai pašai kā eksperimentālajās kultūrās. Tas nozīmē, ka RTG/RS jābūt ne mazākam par 10 %. Lai pierādītu, ka pozitīvās kontroles pieņemamības kritēriji ir izpildīti, pietiek ar vienu koncentrāciju (vai pietiek izmantot vienu no pozitīvās kontroles kultūras koncentrācijām, ja tādas ir vairākas). Turklāt pozitīvās kontroles MF jābūt laboratorijas noteiktā pieņemamā diapazona robežās.

Rezultātu izvērtēšana un interpretēšana

61. *IWGT* Peļu limfomas ekspertu darbgrupa ir daudz izdarījusi MLA bioloģiskā relevantuma un pozitīvas atbildreakcijas kritēriju jomā (4). Tāpēc šajā testēšanas metodē sniegti konkrēti ieteikumi par to, kā interpretēt ar MLA testēto ķimikāliju rezultātus (sk. 62.–64. punktu). TK6 datubāze ir daudz mazāka un

▼M8

nav tikusi izvērtēta darbgrupā. Tāpēc ieteikumi par TK6 datu interpretēšanu ir vispārīgāki (sk. 65.–66. punktu). Papildus doti daži ieteikumi, kas attiecas uz abiem testiem (sk. 67.–71. punktu).

Tikai MLA

62. Lai nodrošinātu MF palielinājuma bioloģisko relevantumu, ieteicama šāda pieeja pozitīvas un negatīvas atbildreakcijas noteikšanā. Tajā neizmanto statistisko analīzi kā vairumā pārējo testu, bet gan iepriekš noteiktu inducēto mutantu biežumu (t. i., MF palielinājumu, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto), ko apzīmē ar vispārējo izvērtējuma koeficientu (GEF), kurš noteikts, analizējot līdzdalīgo laboratoriju iegūto negatīvās kontroles MF datu sadalījumu (4). MLA agara versijā GEF ir 90×10^{-6}, un MLA mikroiedobju versijā GEF ir 126×10^{-6}.

63. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) MF palielinājums, kas pārsniedz paralēlās kontroles uzrādīto, ir lielāks par GEF un palielinājums ir koncentrācijatkarīgs (piem., ar dinamikas rindas trenda testu noteikts). Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas.

64. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu) nav koncentrācijatkarīgas atbildreakcijas vai, ja MF palielinājums ir, tas nepārsniedz GEF. Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj inducēt mutācijas.

Tikai TK6

65. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi pozitīvu, kad pie kāda no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):

— vismaz vienā no testa koncentrācijām salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli novērojams statistiski nozīmīgs palielinājums,

— šo palielinājumu izvērtējot ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu, konstatējams, ka tas ir koncentrācijatkarīgs,

— kāds no rezultātiem ir ārpus vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma (piem., ārpus 95 % kontrolrobežām Puasona sadalījumā; sk. 48. punktu).

Ja visi šie kritēriji izpildīti, šajā testēšanas sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija spēj inducēt mutācijas. Ieteikumi par piemērotākajām statistiskajām metodēm atrodami literatūrā (66)(67).

66. Ja ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par viennozīmīgi negatīvu, kad ne pie viena no vērtētajiem eksperimenta nosacījumiem (sk. 33. punktu):

— nevienā testa koncentrācijā nav statistiski nozīmīga palielinājuma salīdzinājumā ar paralēlo negatīvo kontroli,

— ar attiecīgu dinamikas rindas trenda testu nav konstatējams palielinājuma koncentrācijatkarīgums,

▼M8

— visi rezultāti ir vēsturisko negatīvo kontroļu datu sadalījuma robežās (piem., 95 % kontrolrobežās Puasona sadalījumā); sk. 48. punktu).

Tādā gadījumā šajā testa sistēmā uzskata, ka testējamā ķimikālija nespēj inducēt mutācijas.

Kopīgi MLA un TK6

67. Ja maksimālo koncentrāciju izraugās pēc citotoksicitātes, ar augstāko koncentrāciju būtu jācenšas panākt 20 līdz 10 % lielu RTG/RS. Pastāv vienprātība par to, ka jābūt piesardzīgiem, interpretējot vienīgi 20 līdz 10 % RTG/RS robežās esošos pozitīvos rezultātus, un rezultāts nebūtu jāuzskata par pozitīvu, ja MF palielinājums (ja vērtēts) ir tik tikko 10 % RTG/RS līmenī vai mazāks par to (2)(59).

68. Ja nav kultūras, kas uzrādītu 10–20 % lielu RGT/RS, noteikt, vai testējamā ķimikālija ir mutagēna, zināmos apstākļos var palīdzēt papildu informācija. Šīs situācijas ir šādas: 1) datu punktu rindas no 100 % līdz 20 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un vismaz viens datu punkts atrodas 20 līdz 25 % RTG/RS robežās; 2) datu punktu rindas no 100 % līdz 25 % RTG/RS robežās nedod mutagenitātes pierādījumus (t. i., nav konstatējama atbildreakcijas atkarība no devas, mutantu biežums nav lielāks kā paralēlajā negatīvajā kontrolē vai vēsturiskajos fona diapazonos u. c.), un ir arī viens negatīvs datu punkts nedaudz zem 10 % RTG/RS līmeņa. Abās šajās situācijās var secināt, ka testējamā ķimikālija ir negatīva.

69. Nepārprotami pozitīva vai negatīva atbildreakcija nav obligāti jāverificē.

70. Ja atbildreakcija nav atbilstoši iepriekš rakstītajam nedz nepārprotami negatīva, nedz nepārprotami pozitīva un/vai lai rezultāta bioloģiskais relevantums būtu labāk nosakāms, šie dati jāizvērtē ekspertam un/vai jāturpina pētīt. Var būt lietderīgi izdarīt atkārtotu eksperimentu ar modificētiem nosacījumiem [piem., koncentrācijas intervāliem, kas palielinātu varbūtību iegūt datu punktus 10–20 % RTG/RS diapazonā, atšķirīgi metaboliskās aktivācijas nosacījumi (proti, S9 koncentrācija vai S9 avots) un apstrādes ilgums].

71. Retos gadījumos pat pēc sīkākas izpētes datu kopums neļauj izdarīt slēdzienu par pozitīviem vai negatīviem rezultātiem. Tāpēc būtu jāsecina, ka testējamās ķimikālijas atbildreakcija bijusi neskaidra (to vienlīdz varbūtīgi ir interpretēt gan kā pozitīvu, gan kā negatīvu).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

72. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams,

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma,

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma,

▼**M8**

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības,

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. tml.

Daudzkomponentu viela, UVCB un maisījumi:

— iespējami izsmeļoši raksturoti pēc komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums,

— šķīdinātāja īpatsvars galīgajā kultūras barotnē.

Šūnas:

Laboratorijas izejkultūru gadījumā:

— šūnu tips un avots un to vēsture testēšanas laboratorijā,

— kariotipiskās īpašības un/vai modālais hromosomu skaits,

— šūnu kultūru uzturēšanas metodes,

— mikoplazmas neesība,

— šūnu dubultošanās laiks.

Testēšanas nosacījumi:

— koncentrāciju izvēles un šūnu kultūru skaita izraudzīšanās pamatojums, piem., dati par citotoksicitāti un šķīdības ierobežojumi,

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija, mitruma līmenis,

— testējamās ķimikālijas koncentrācija, izteikta kā galīgā koncentrācija kultūras barotnē (piem., kultūras barotnes µg vai mg/ml vai mM),

— kultūras barotnē pievienotā šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas koncentrācija (un/vai tilpums),

— inkubācijas temperatūra,

— inkubācijas laiks,

— apstrādes ilgums,

— šūnu blīvums apstrādes laikā,

▼**M8**

— metaboliskās aktivācijas sistēmas veids un sastāvs (S9 avots, S9 maisījuma sagatavošanas metode, S9 maisījuma koncentrācija vai tilpums un S9 koncentrācija vai tilpums galīgajā kultūras barotnē, S9 kvalitātes kontroles),

— attiecībā uz katru no apstrādes nosacījumiem — pozitīvās un negatīvās kontroles vielas, galīgās koncentrācijas,

— fenotipiskās ekspresijas periods (norādot uzsēto šūnu skaitu, subkultūras un attiecīgā gadījumā barošanas grafiku),

— selektīvā aģenta identitāte un koncentrācija,

— MLA gadījumā norāda izmantoto versiju (agars vai mikroiedobes),

— testu pieņemamības kritēriji,

— dzīvotspējīgo šūnu un mutantšūnu skaitīšanas metodes,

— citotoksicitātes mērīšanas metodes,

— jebkāda citotoksicitātei un izmantotajai metodei relevanta papildinformācija,

— inkubācijas laiks pēc uzsēšanas,

— uzskaitīto koloniju lielums un veids (attiecīgā gadījumā norādot kritērijus, pēc kuriem kolonijas definē kā "mazas" vai "lielas"),

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai pētījuma rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un izgulsnēšanās noteikšanai izmantotās metodes.

Rezultāti:

— par katru kultūru — apstrādāto šūnu un apakškultūrām izmantoto šūnu skaits,

— toksicitātes parametri (MLA gadījumā RTG, un TK6 gadījumā RS),

— izgulsnēšanās pazīmes un noteikšanas laiks,

— selektīvā un neselektīvā barotnē uzsēto šūnu skaits,

— koloniju skaits neselektīvajā barotnē un rezistento koloniju skaits selektīvajā barotnē, saistītais mutantu biežums,

— koloniju lielums negatīvajā un pozitīvajā kontrolē un (ja testējamā ķimikālija ir pozitīva) vismaz pie vienas koncentrācijas un saistītais mutantu biežums,

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība,

— paralēlo negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji),

— vēsturisko negatīvo (šķīdinātājs) un pozitīvo kontroļu dati (koncentrācijas un šķīdinātāji), norādot diapazonus, vidējās vērtības un standartnovirzes, vēsturisko kontroļu pamatā esošo testu skaits,

▼M8

— statistiskās analīzes (par atsevišķām kultūrām un attiecīgā gadījumā par apkopotiem replikātiem) un p-vērtības, ja tādas ir. MLA gadījumā – arī GEF izvērtējums.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), 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. and 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., 35 (3): 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. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 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. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 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. and 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., 47 (1): 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. and 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., 627 (1): 36-40.

(6) 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.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine--Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and 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., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and 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., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and 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., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and 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., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and 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., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and 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., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and 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., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and 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., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and 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., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 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*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and 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 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and 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 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and 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., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and 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., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and 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., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and 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., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Aneigēns: ķimikālija vai process, kas mijiedarbībā ar mitotiskā un mejotiskā šūnu dalīšanās cikla komponentiem izraisa šūnu vai organismu aneiploīdiju.

Aneiploīdija: novirze no normālā diploīdā (vai haploīdā) hromosomu skaita par vienu vai vairākām atsevišķām hromosomām, bet ne par veselu hromosomu komplektu vai komplektiem (poliploīdija).

Bāzu pāru maiņas mutagēni: ķimikālijas, kas izraisa DNS bāzu pāru maiņu.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Klonēšanās efektivitāte: to zemā blīvumā uzsēto šūnu procents, no kurām var izaugt pieskaitāma kolonija.

Klastogēns: ķimikālija vai process, kas šūnu vai organismu populācijās izraisa strukturālas hromosomu aberācijas.

Citotoksicitāte: attiecībā uz šīs testēšanas metodes aptverto ķīmisko analīzi citotoksicitāte ir relatīvā kopējā pieauguma (RTG) samazinājums MLA gadījumā vai relatīvās izdzīvotības (RS) samazinājums TK6 gadījumā.

Tieša mutācija: tāda gēna mutācija no vecāktipa uz mutantformu, kura maina vai izdzēš iekodētā proteīna fermentatīvo darbību vai tā funkciju.

Nolasīšanas fāzes nobīdes mutagēni: ķimikālijas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanos vai izzušanu.

Genotoksisks: vispārīgs termins, kas aptver visu veidu bojājumus DNS vai hromosomās, tostarp DNS pārrāvumus, aduktus, pārkārtojumus, mutācijas, hromosomu aberācijas un aneiploīdiju. Ne visas genotoksiskās ietekmes rada mutācijas vai noturīgus hromosomu bojājumus.

Mitotiskā rekombinācija: mitozes laikā notiekoša homoloģisku hromatīdu rekombinācija, kuras rezultātā var inducēties DNS dubultpavedienu pārrāvumi vai zust heterozigotāte.

Mutagēnisks: tāds, kas pārmantojami maina vienu vai vairākas DNS bāzu pāru sekvences gēnos vai hromosomu struktūru (hromosomu aberācijas).

Mutantu biežums (MF): novēroto mutantšūnu skaita attiecība pret dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Fenotipiskās ekspresijas laiks: pēcapstrādes laiks, kad ģenētiskā pārmaiņa nostiprinās genomā un jebkādi līdzšinējā gēna produkti izsīkst tiktāl, ka mainās arī fenotipiskā pazīme.

Relatīvā izdzīvotība (RS): RS attiecībā uz TK6 izmanto par apstrādes radīta citotoksicitātes mēru. Tā ir tūlīt pēc apstrādes uz platēm uzsētu šūnu relatīvā klonēšanās efektivitāte (CE) salīdzinājumā ar negatīvās kontroles klonēšanās efektivitāti.

▼M8

Relatīvais suspensijas pieaugums (RSG): MLA gadījumā tas ir relatīvais kopējais suspensijas divdienu pieaugums testa kultūrā attiecībā pret kopējo suspensijas divdienu pieaugumu negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975). Ar RSG būtu jāizsaka testa kultūras un negatīvās/šķīdinātāja kontroles relatīvā pieauguma salīdzinājums apstrādes periodā.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): RTG attiecībā uz MLA izmanto par apstrādes radītas citotoksicitātes mēru. Tas ir testa kultūru relatīvā pieauguma mērs (salīdzinājumā ar nesēja kontroli) noteiktās testa fāzēs, proti, apstrādē, divu dienu ilgajā ekspresijas laikā un atlasīšanai vajadzīgo mutantu klonēšanā. Katras testa kultūras RSG tiek reizināts ar testa kultūras relatīvo klonēšanas efektivitāti mutantu atlasīšanas laikā un izteikts attiecībā pret klonēšanas efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē (Clive and Spector, 1975).

Aknu S9 frakcijas: aknu homogenāta supernatants pēc centrifugēšanas pie 9 000 g, t. i., jēlu aknu ekstrakts.

S9 maisījums: aknu S9 frakcijas un metaboliskajai fermentatīvajai darbībai nepieciešamo kofaktoru maisījums.

Suspensijas pieaugums (SG): MLA apstrādes un ekspresijas fāzes laikā konstatētā šūnu skaita palielinājuma reižu skaits. Īslaicīgā (3–4 stundu ilgā) apstrādē SG tiek aprēķināts, reizinot palielinājuma reižu skaitu 1. dienā un palielinājuma reižu skaitu 2. dienā. Ja izmanto 24 stundu ilgu apstrādi, SG ir 24 stundu apstrādes laikā notikušā palielinājuma reižu skaits, reizināts ar ekspresijas 1. un 2. dienā notikušā palielinājuma reižu skaitu.

Šķīdinātāja kontrole: vispārīgs termins, ar ko definē kontroles kultūras, kuras saņem vienīgi testējamās ķimikālijas šķīdināšanai izmantoto šķīdinātāju.

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Neapstrādātās kontroles: kultūras, kuras neapstrādā (t. i., ne ar testējamo ķimikāliju, ne ar šķīdinātāju), bet ar kurām izdara tādas pašas manipulācijas kā ar kultūrām, kuras apstrādā ar testējamo ķimikāliju.

▼M8

2. papildinājums

FORMULAS

Citotoksicitāte

Abām (agara un mikroiedobju) MLA versijām

Citotoksicitāti definē kā relatīvo kopējo pieaugumu (RTG), un tas ietver relatīvo suspensijas pieaugumu (RSG) divu dienu ilgajā ekspresijas periodā un relatīvo klonēšanās efektivitāti (RCE), kuru nosaka mutantu atlases brīdī. Gan RTG, gan RSG un RCE izsaka procentuāli.

RSG aprēķināšana. Suspensijas pieaugums viens (SG_1) ir pieauguma temps laikā no 0. dienas līdz 1. dienai (šūnu koncentrācija 1. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 0. dienā), un suspensijas pieaugums divi (SG_2) ir pieauguma temps laikā no 1. dienas līdz 2. dienai (šūnu koncentrācija 2. dienā, dalīta ar šūnu koncentrāciju 1. dienā). RSG ir apstrādātās kultūras kopējais SG (SG_1 x SG_2) salīdzinājumā ar neapstrādāto/šķīdinātāja kontroli. Tas ir: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$]. SG_1 aprēķināms no sākotnējās šūnu koncentrācijas, kas izmantota šūnu apstrādes sākumā. Šādā veidā tiek ņemta vērā šūnu apstrādes laikā testa kultūrās izveidojusies diferenciāla citotoksicitāte, ja tāda ir.

RCE ir testa kultūras relatīvā klonēšanās efektivitāte mutantu atlasīšanas brīdī attiecībā pret klonēšanās efektivitāti negatīvajā/šķīdinātāja kontrolē.

Relatīvais kopējais pieaugums (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Relatīvā izdzīvotība (RS)

Citotoksicitāti vērtē pēc relatīvās izdzīvotības, t. i., pēc tā, kāda ir tūlīt pēc apstrādes uzsētu šūnu klonēšanās efektivitāte (CE), kas koriģēta pēc jebkāda šūnu zuduma apstrādes laikā, salīdzinājumā ar klonēšanās efektivitāti negatīvajās kontrolēs (tajās konstatēto izdzīvotību pieņem par 100 %). Ar apstrādes laikā radušos šūnu zudumu saistīto korekciju var aprēķināt šādi:

$$\text{Koriģētā CE} = \text{CE} \times \frac{Number\ of\ cells\ at\ the\ end\ of\ treatment}{Number\ of\ cells\ at\ the\ beginning\ of\ treatment}$$

RS ar testējamo ķimikāliju apstrādātai kultūrai aprēķina šādi:

$$RS = \frac{Adjusted\ CE\ in\ the\ treated\ culture}{Adjusted\ CE\ in\ the\ solvent\ control} \times 100$$

Mutantu biežums attiecībā uz MLA un uz TK6

Mutantu biežums (MF) ir mutantkoloniju klonēšanās efektivitāte selektīvā barotnē (CE_M), kas koriģēta pēc klonēšanās efektivitātes neselektīvā barotnē mutantu atlasīšanas brīdī (CE_V), respektīvi, $MF=CE_M/CE_V$. Zemāk aprakstīts, kā šīs divas klonēšanās efektivitātes aprēķināmas agara un mikroiedobju metodes gadījumā.

▼**M8**

MLA agara versija. MLA mīkstā agara versijā koloniju skaitu uz mutantu atlasīšanas plates (C_M) un koloniju skaitu uz atlasīšanai neparedzētās jeb klonēšanās efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) plates (C_V) nosaka, tiešā veidā saskaitot klonus. Ja klonēšanās efektivitātes (CE) vajadzībai uz mutantu atlasīšanas (CE_M) platēm un uz atlasīšanai neparedzētām jeb klonēšanas efektivitātes (dzīvotspējas uzskaites) platēm (CE_V) uzsēj 600 šūnas un mutantu atlasīšanai izmanto 3 x 10^6 šūnas,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

MLA un TK6 mikroiedobju versija. MLA mikroiedobju versijā C_M un C_V tiek noteikta, reizinot mikroiedobju kopskaitu (TW) un to koloniju varbūtīgo skaitu, kas ir katrā mikroiedobju plates iedobē (P).

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Pēc Puasona sadalījuma (Furth et al., 1981) nulles terma P iegūst šādi:

$P = - \ln (EW / TW)$,

kur EW ir tukšās iedobes un TW ir iedobju kopskaits. Tādējādi

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Mazo un lielo koloniju mutantu biežumu MLA mikroiedobju versijā aprēķina tieši tāpat, tukšo iedobju skaitu attiecinot uz mazajām un lielajām kolonijām.

TK6 gadījumā mazo un lielo koloniju mutantu biežumu nosaka, pamatojoties uz agrīnajiem un vēlīnajiem mutantiem.

▼M8

B.68. **ĪSA EKSPOZĪCIJAS LAIKA IN VITRO TESTĒŠANAS METODE, AR KURU IDENTIFICĒT i) ĶIMIKĀLIJAS, KAS IZRAISA NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, UN ii) ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ KĀ ACU KAIRINĀJUMA VAI NOPIETNU ACU BOJĀJUMU IZRAISĪTĀJAS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 491 (2017) aprakstītajam. Īsa ekspozīcijas laika (*STE*) testēšanas metode ir *in vitro* metode, kuru noteiktos apstākļos un ar zināmiem ierobežojumiem var lietot tādu ķimikāliju (vielu un maisījumu) bīstamības klasificēšanai un marķēšanai, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai kuras nav jāklasificē kā nopietnu acu bojājumu vai acu kairinājuma izraisītājas, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]).

2. Ilgus gadus ķimikāliju potenciālā bīstamība acīm tikusi vērtēta galvenokārt ar truša acu *in vivo* testu (TM B.5 (8), ekvivalents OECD TG 405). Ir vispārpieņemts, ka pārskatāmā nākotnē neviens atsevišķs alternatīvs *in vitro* tests nespēs pilnībā aizstāt truša acu *in vivo* testu, ar kuru var prognozēt pilnu nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakciju spektru un vienlaikus aptvert dažādas ķīmisko vielu klases. Tomēr truša acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanā stratēģiski kombinējot alternatīvas testēšanas metodes (2). Ar lejupēju pieeju tiktu testētas ķimikālijas, par kurām ir informācija, ka tās ir potenciāli ļoti kairinošas acīm vai izraisa nopietnus acu bojājumus. Ar augšupēju pieeju turpretim testētu ķimikālijas, par kurām ir informācija, ka tās acīm nav tik kairinošas, lai būtu jāklasificē. Kaut arī *STE* testēšanas metodi nevar uzskatīt par pilnīgu truša acu *in vivo* testa aizstājēju, normatīvām vajadzībām veiktas klasificēšanas un marķēšanas kontekstā tā ir piemērota izmantošanai tādā pakāpjveida testēšanas stratēģijā kā augšupējā/lejupējā pieeja un ļauj bez turpmākas testēšanas identificēt i) ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija), un ii) ķimikālijas (izņemot ļoti gaistošas vielas un visas cietās ķimikālijas, kas nav virsmaktīvās vielas), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas) (1)(2). Tomēr, ja ar *STE* testēšanas metodi ķimikālija netiek klasificēta kā nopietnu acu bojājumu izraisītāja (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) vai kā ANO GHS / *CLP* nekategorizēta ķimikālija (neizraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu), būs vajadzīga papildu testēšana, lai noteiktu galīgo klasifikāciju. Turklāt, pirms ar augšupēju pieeju *STE* testēšanas metodi izmantot klasifikācijas shēmā, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm. Piemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata kontekstā ar ESAO Norādījumu dokumentu par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanā un novērtēšanā [*OECD Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation*] (14).

3. Šajā testēšanas metodē aprakstītas procedūras, ko izmanto, lai testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm izvērtētu pēc tās spējas inducēt citotoksicitāti, ja pielieto īsa ekspozīcijas laika testēšanas metodi. Ķimikāliju citotoksiskā iedarbība uz radzenes epitēlijšūnām ir nozīmīga veida iedarbība

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼**M8**

(*MOA*), kas izraisa radzenes epitēlijšūnu bojājumus un acu kairinājumu. Šūnu dzīvotspēju ar *STE* testēšanas metodi novērtē pēc tā, cik lielā mērā vitālo krāsvielu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijbromīds, saukts arī par tiazolilzilo tetrazolijbromīdu) dzīvās šūnas fermentatīvi pārvērš par zilas krāsas formazāna sāli, kura daudzumu šūnu ekstraktā nosaka kvantitatīvi (3). Iegūto šūnu dzīvotspēju salīdzina ar šķīdinātāja kontroli (relatīvā dzīvotspēja) un izmanto, lai aplēstu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm. Ja gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir mazāka par vai vienāda ar (≤) 70 %, testējamo ķimikāliju klasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā. Ja turpretim gan ar 5 %, gan ar 0,05 % koncentrāciju iegūtā šūnu dzīvotspēja ir lielāka par (>) 70 %, pieņem, ka testējamo ķimikāliju nav vajadzības kategorizēt ANO GHS / *CLP* sistēmā.

4. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts, bez sasaistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā. Definīcijas dotas papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

5. Šīs testēšanas metodes pamatā ir Kao korporācijas izstrādātais protokols (4), kas izvērtēts divos dažādos validācijas pētījumos: vienu no tiem veikusi Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu sabiedrība (*JSAAE*) (5), bet otru – Japānas Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*) (6). Pamatojoties uz šo validācijas pētījumu pārskatiem un citiem testēšanas metodi pamatojošiem dokumentiem, zinātnisko recenzēšanu veica *NICEATM/ICCVAM* (7).

6. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķimikālijas (vielas un maisījumus), kas izraisa nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) (1), iegūtie dati par 125 ķimikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 83 % (104/125), pseidopozitīvu īpatsvaru 1 % (1/86) un pseidonegatīvu īpatsvaru 51 % (20/39) (7). Uzrādītais pseidonegatīvu īpatsvars šajā kontekstā nav kritiski svarīgs, jo visas testējamās ķimikālijas, kuru inducētā šūnu dzīvotspēja pie 5 % koncentrācijas ir ≤ 70 % un pie 0,05 % koncentrācijas > 70 %, vēlāk tiks testētas ar citām pienācīgi validētām *in vitro* testēšanas metodēm vai – kritiskā gadījumā – ar truša acu *in vivo* testu, izvēli izdarot atkarībā no normatīvajām prasībām un saskaņā ar patlaban ieteiktajām secīgas testēšanas stratēģijas un pierādījumu izsvēršanas pieejām (1) (8). Testētas tika galvenokārt vienkomponenta vielas, bet ir arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanā šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama. Tomēr pirms tās izmantošanas maisījuma testēšanai, lai iegūtu datus kādam normatīvajam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā klasificējamu testējamo ķimikāliju identificēšanai, nekādus citus īpašus trūkumus tā neuzrādīja. Pētnieki var apsvērt šīs testēšanas metodes izmantošanu ar testējamajām ķimikālijām, un tā tiktu pieņemts, ka šūnu dzīvotspēja ≤ 70 % gan pie 5 %, gan pie 0,05 % koncentrācijas uzrāda nopietnus acu bojājumus inducējošu atbildreakciju, un ķimikālija bez turpmākas testēšanas būtu jāklasificē ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā.

▼**M8**

7. Kad *STE* testēšanas metodi izmantoja, lai identificētu ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (t. i., ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), iegūtie dati par 130 ķimikālijām (gan vielām, gan maisījumiem) salīdzinājumā ar truša acu *in vivo* testu uzrādīja kopējo pareizību 85 % (110/130), pseidonegatīvu īpatsvaru 12 % (9/73) un pseidopozitīvu īpatsvaru 19 % (11/57) (7). Ja no datu kopas izslēdz ļoti gaistošas vielas un cietas vietas, kas nav virsmaktīvās vielas, kopējā pareizība pieaug līdz 90 % (92/102), pseidonegatīvu īpatsvars sarūk līdz 2 % (1/54) un pseidopozitīvu īpatsvars saglabājas 19 % (9/48) (7) Sekas ir tādas, ka tad, ja *STE* tiek izmantota, lai identificētu testējamās ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), metodes potenciālie trūkumi ir liels pseidonegatīvu īpatsvars i) ļoti gaistošām vielām ar tvaika spiedienu virs 6 kPa un ii) cietām ķimikālijām (vielām un maisījumiem), kas nav virsmaktīvās vielas un maisījumi, kuru sastāvā ir vienīgi virsmaktīvās vielas. Šādas ķimikālijas ir izslēgtas no *STE* testēšanas metodes piemērojamības jomas (7).

8. Papildus 6. un 7. punktā minētajām ķimikālijām ar *STE* testēšanas metodi ģenerētajā datu kopā ietilpst arī pašmāju dati par 40 maisījumiem. Šie dati, kad tos salīdzināja ar Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testa spēju paredzēt, kuri maisījumi nav jāklasificē ANO GHS / *CLP* klasifikācijas sistēmā, uzrādīja pareizību 88 % (35/40), pseidopozitīvu īpatsvaru 50 % (5/10) un pseidonegatīvu īpatsvaru 0 % (0/30) (9). Tāpēc *STE* metodi var izmantot, lai ar augšupēju pieeju identificētu identificētu maisījumus kā ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas. Tāpat kā cieto vielu gadījumā, izņēmums ir cietie maisījumi, ja vien tie pilnībā nesastāv no virsmaktīvajām vielām. Turklāt, lai nepieļautu to, ka ķimikālijas kaitīgums tiek paredzēts nepietiekami, ar sevišķu rūpību jāvērtē maisījumi, kuru sastāvā ir vielas ar tvaika spiedienu virs 6 kPa, un iegūtie rezultāti jāpamato katrā atsevišķā gadījumā.

9. Tā kā ar *STE* testēšanas metodi daudzas ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas ķimikālijas tiek nepietiekami stingri novērtētas, ierindojot tās 2., 2A vai 2B kategorijā, savukārt daudzas ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas tiek novērtētas pārlieku stingri, tāpat ierindojot tās 2., 2A vai 2B kategorijā, *STE* testēšanas metodi nevar izmantot, lai testējamās ķimikālijas identificētu kā tādas, kas ietilpst ANO GHS / *CLP* 2.kategorijā vai ANO GHS / *CLP* 2A kategorijā (acu kairinājums) vai 2B kategorijā (viegls acu kairinājums) (7). Tālab var būt nepieciešams veikt turpmāku testēšanu ar citu piemērotu metodi.

10. *STE* testēšanas metode ir derīga testējamajām ķimikālijām, kuras izšķīdinātas vai vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendētas fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % dimetilsulfoksīda (DMSO), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. *STE* testēšanas metode nav derīga testējamajām ķimikālijām, kuras ir nešķīstošas vai kuras nevar vismaz 5 minūšu ilgumā vienmērīgi suspendēt fizioloģiskajā šķīdumā, 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, vai minerāleļļā. Minerāleļļu *STE* testēšanas metodē ir iespējams izmantot tāpēc, ka ekspozīcijas laiks ir īss. Tāpēc *STE* testēšanas metode ir piemērota, lai paredzētu ūdenī nešķīstošu testējamo ķimikāliju (piem., garķēdes alifātisko spirtu vai ketonu) potenciālo bīstamību acīm, ja vien šīs ķimikālijas ir iespējams iejaukt kādā no trijiem iepriekš nosauktajiem šķīdinātājiem.

▼M8

11. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([1]), bez sasaistes ar *STE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

TESTA PRINCIPS

12. *STE* testēšanas metode ir uz citotoksicitātes principa pamatota *in vitro* ķīmiskā analīze, kuru veic uz saplūstoša *SIRC* (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) šūnu monoslāņa, kas kultivēts uz 96 mikroiebobju polikarbonāta platēm (4). Testējamajai ķimikālijai ļauj iedarboties piecas minūtes, un tad, izmantojot MTT ķīmisko analīzi, citotoksicitāti kvantitatīvi izmēra *SIRC* šūnu relatīvās dzīvotspējas izteiksmē (4). Pēc konstatētā šūnu dzīvotspējas samazinājuma paredz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi, kas var izraisīt acs bojājumus.

13. Ir zināms, ka 80 % no truša acī iepilinātā šķīduma trīs līdz četru minūšu laikā tiek izvadīti caur konjunktīvas maisu, bet cilvēka gadījumā vienas līdz divu minūšu laikā šādā veidā tiek izvadīti vairāk nekā 80 % iepilinātā šķīduma (10). Ar *STE* testēšanas metodi ir mēģināts tuvināties šiem ekspozīcijas laikiem, un citotoksicitāte tiek izmantota par beigupunktu, lai novērtētu kaitējumu, kas *SIRC* šūnām nodarīts piecās minūtēs, kuru laikā uz tām iedarbojusies testējamā ķimikālija.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

14. Pirms šeit aprakstīto *STE* testēšanas metodi sākt izmantot regulāri, laboratorijām jāpierāda tehniskā kompetence, pareizi saklasificējot 1. tabulā ieteiktās 11 vielas. Šīs vielas izraudzītas tā, lai būtu pārstāvēts pilns nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma atbildreakciju spektrs, kas noteikts ar truša acu *in vivo* testiem (TG-405) un atbilst ANO GHS / *CLP* klasifikācijas sistēmai (1). Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība, kvalitatīvu *in vivo* references datu pieejamība un kvalitatīvu ar *STE* testēšanas metodi iegūtu *in vitro* datu pieejamība (3). Gadījumos, kur kāda sarakstā norādīta viela nav pieejama vai kur tas attaisnojami, var izmantot citu vielu, par kuru pieejami pietiekami *in vivo* un *in vitro* references dati, ja vien tiek izmantoti šeit aprakstītie kritēriji.

1. tabula

Standartvielu saraksts

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregātstāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
Benzalkonija hlorīds (10 %, ūdens šķīdums)	8001-54-5	Onijsavienojums	Šķidrs	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ēteris	Šķidrs	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija

([1]) 2013. gada jūnijā kopīgajā sanāksmē tika panākta vienošanās jaunajās un atjauninātajās testēšanas metodēs, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai turpmāk konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

▼**M8**

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregātstāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
Acid Red 92	18472-87-2	Heterociklisks savienojums; bromīn-savienojums; hlorīnsavienojums	Ciets	1. kategorija	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Nātrija hidroksīds	1310-73-2	Sārms; neorganiska ķīmiska viela	Ciets	1.kategorija ([3])	Fizioloģiskais šķīdums	1.kategorija
Butirolaktons	96-48-0	Laktons; heterociklisks savienojums	Šķidrs	2A kategorija (*CLP* 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
1-oktanols	111-87-5	Spirts	Šķidrs	2A/B kategorija ([4]) (*CLP* 2.kategorija)	Minerāleļļa	Nav iespējams prognozēt
Ciklopentanols	96-41-3	Spirts; ogļūdeņradis, ciklisks	Šķidrs	2A/B kategorija ([5]) (*CLP* 2.kategorija)	Fizioloģiskais šķīdums	Nav iespējams prognozēt
2-etoksietilacetāts	111-15-9	Spirts; ēteris	Šķidrs	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts
Dodekāns	112-40-3	Ogļūdeņradis, aciklisks	Šķidrs	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts
Metilizobutilketons	108-10-1	Ketons	Šķidrs	Nekategorizēts	Minerāleļļa	Nekategorizēts

▼M8

Viela	*CAS* Nr.	Ķimikāliju klase ([1])	Agregātstāvoklis	*In vivo* ANO GHS / *CLP* Kat. ([2])	Šķīdinātājs *STE* testā	*STE* ANO GHS / *CLP* Kat.
1,1-dimetilguanidīnsulfāts	598-65-2	Amidīns; sēra savienojums	Ciets	Nekategorizēts	Fizioloģiskais šķīdums	Nekategorizēts

([1]) Ķīmiskās klases piešķirtas, vadoties pēc informācijas no agrākajām *NICEATM* publikācijām un, ja tādas nebija pieejamas, vadoties pēc ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatora (MeSH®) (ar ChemIDplus® [Nacionālās medicīnas bibliotēkas] starpniecību; pieejama http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) un pēc *NICEATM* noteiktajām struktūrām.

([2]) Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa (ESAO TG 405) rezultātiem un izmantojot ANO GHS / *CLP* sistēmu (1).

([3]) Klasificēšana 1. kategorijā izdarīta, pamatojoties uz 100 % nātrija hidroksīda (ESAO TG 435 norādīts kā ādas koroziju izraisītspējīga standartviela) korozīvo potenciālu ādai un uz kritēriju iekļaušanai ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā (1).

([4]) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 2 no 6 dzīvniekiem vai 4 no 6 dzīvniekiem. *In vivo* datu kopa aptvēra 2 pētījumus ar 3 dzīvniekiem katrā. Vienā pētījumā 7. dienā ietekme bija novērojama 2 no 3 dzīvniekiem, un tas dod pamatu klasificēšanai 2A kategorijā (11), bet otrā pētījumā visi beigupunkti visiem 3 dzīvniekiem līdz 7. dienai no jauna atradās kaitējuma nulles līmenī, un tas dod pamatu klasificēšanai 2B kategorijā (12).

([5]) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu un konjunktīvas apsārtumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1 un konjunktīvas apsārtuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 11. dienā.

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.

PROCEDŪRA

Šūnu monoslāņa sagatavošana

15. *STE* testēšanas metodē jāizmanto truša radzenes (*SIRC*) šūnu līnija. *SIRC* šūnas ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas *CCL60*.

16. *SIRC* šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO_2 un mitrinātā atmosfērā kultivēšanas kolbā ar kultūras barotni, kura sastāv no Īgla minimālās barotnes (*MEM*), kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 2 mM *L*-glutamīna, 50–100 vienībām/ml penicilīna un 50–100 µg/ml streptomicīna. Kultivēšanas kolbā kofluējušās šūnas jāatdala, izmantojot tripsīna-etilēndiamīntetraetiķskābes šķīdumu. Atdalīšanai var lietot šūnu skrāpi. Pirms šūnas izmantot rutīnas testiem, kultivēšanas kolbā tās jāpavairo (piem., 2–3 pārsējumos). Pēc atkausēšanas šūnas nebūtu jāpavairo vairāk kā 25 pārsējumos.

17. Pēc tam izmantošanai *STE* testā gatavās šūnas sagatavo attiecīgā šūnu slāņa biezumā un uzsēj uz 96 iedobju mikrotitrēšanas plates. Ieteicamais šūnu uzsēšanas blīvums ir $6{,}0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto četras dienas pēc uzsēšanas, vai $3{,}0 \times 10^3$ šūnas uz vienu iedobi, ja šūnas lieto piecas dienas pēc uzsēšanas, pie kultivēšanas tilpuma 200 µl. *STE* testā izmantojamās šūnas, kas kultūras barotnē uzsētas atbilstošā biezumā, līdz testēšanas brīdim, t. i., četrās vai piecās dienās pēc uzsēšanas, sasniegs vairāk nekā 80 % kofluenci.

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

18. Vēlamākais šķīdinātājs, kurā izšķīdināt vai suspendēt testējamo ķimikāliju, ir fizioloģiskais šķīdums. Ja testējamā ķimikālija ir mazšķīstoša vai vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta fizioloģiskajā šķīdumā, otrā labākā izvēle ir 5 % DMSO (CAS Nr. 67-68-5), kas

▼M8

izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Ja testējamā ķimikālija vismaz uz piecām minūtēm nevar tikt vienmērīgi izšķīdināta vai suspendēta ne fizioloģiskajā šķīdumā, ne 5 % DMSO, kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā, nākamā izvēle ir minerāleļļa (CAS Nr. 8042-47-5).

19. Izvēlētajā šķīdinātājā testējamo ķimikāliju vienmērīgi izšķīdina vai suspendē 5 % (masa/masa) koncentrācijā un pēc tam, izmantojot sērijveida 10-kārtēju atšķaidījumu, atšķaida līdz 0,5 % un 0,05 % koncentrācijai. Katra testējamā ķimikālija jātestē gan 5 %, gan 0,05 % koncentrācijā. Uz 96 iedobju plates kultivētās šūnas katrā iedobē piecas minūtes istabas temperatūrā eksponē 200 mikrolitriem (µl) testējamās ķimikālijas šķīduma (vai suspensijas), kuras koncentrācija ir 5 % vai 0,05 %. Testējamās ķimikālijas (vienkomponenta vielas, daudzkomponentu vielas vai maisījumus) uzskata par tīrām vielām un neatkarīgi no to patiesās tīrības atšķaida vai suspendē saskaņā ar aprakstīto metodi.

20. Katrā atkārtojumā uz katras plates par barotnes kontroli izmanto 16. punktā aprakstīto kultūras barotni. Turklāt katrā atkārtojumā uz katras plates šūnas jāeksponē arī šķīdinātāja kontroles paraugiem. Ir pierādīts, ka 18. punktā aprakstītajiem šķīdinātājiem nav kaitīgas ietekmes uz *SIRC* šūnu dzīvotspēju.

21. *STE* testēšanas metodē par pozitīvo kontroli katrā atkārtojumā uz katras plates jāizmanto 0,01 % nātrija laurilsulfāts (SLS), kas izšķīdināts fizioloģiskajā šķīdumā. Lai varētu aprēķināt šūnu dzīvotspēju pozitīvajā kontrolē, katrā atkārtojumā uz katras plates jāiekļauj arī fizioloģiskā šķīduma kontrole.

22. Lai noteiktu, kā kompensēt optisko blīvumu, būs vajadzīgs tukšais paraugs, un to pielieto iedobēm, kurās ir tikai fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas nesatur kalciju un magniju (PBS-) vai šūnas.

23. Ikviens paraugs (testējamā ķimikālija 5 % un 0,05 % koncentrācijā, barotnes kontrole, šķīdinātāja kontrole un pozitīvā kontrole) jātestē trīs reizes katrā atkārtojumā, uz piecām minūtēm istabas temperatūrā šūnas eksponējot 200 mikrolitriem attiecīgās testējamās vai kontroles ķimikālijas.

24. Etalonvielas ir lietderīgi izmantot, lai novērtētu kādai konkrētai ķimikāliju vai produktu klasei piederīgas nezināmas ķimikālijas spēju izraisīt acu kairinājumu vai arī lai novērtētu kāda acu kairinātāja relatīvo spēju izsaukt noteiktas intensitātes atbildreakciju uz kairinājumu.

Šūnu dzīvotspējas mērīšana

25. Pēc eksponēšanas šūnas divreiz mazgā ar 200 µl PBS un tad pievieno 200 µl MTT šķīduma (0,5 mg MTT uz mililitru kultūras barotnes). Pēc divu stundu ilga reakcijas laika inkubatorā (37°C, 5 % CO_2) dekantē MTT šķīdumu, tad MTT formazānu ekstrahē, uz 60 minūtēm istabas temperatūrā tumsā pievienojot 200 mikrolitrus (µl) 0,04 N sālsskābes ar izopropanolu, un pie 570 nm ar mikroplašu lasītāju izmēra MTT formazāna šķīduma absorbciju. Testējamo ķimikāliju interference ar MTT ķīmisko analīzi (ar krāsvielām vai tiešiem MTT reducētājiem) rodas tikai tad, ja pēcekspozīcijas skalošanas laikā no testa sistēmas paliek neizvadīts ievērojams daudzums testējamās ķimikālijas. Tas ir aktuāli gadījumā ar trīsdimensionālajiem rekonstruētas cilvēka radzenes vai rekonstruētas cilvēka epidermas audiem, bet neattiecas uz divdimensionālajām šūnu kultūrām, kuras izmanto *STE* testēšanas metodē.

▼M8

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

26. Par katru testējamo ķimikāliju iegūtās optiskā blīvuma (OB) vērtības izmanto, lai aprēķinātu šūnu dzīvotspēju salīdzinājumā ar šķīdinātāja kontroli, kurai to pieņem par 100 %. Šūnu relatīvo dzīvotspēju izsaka ar procentuālo īpatsvaru, testējamās ķimikālijas OB dalot ar šķīdinātāja kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570}\ of\ test\ chemical) - (OD_{570}\ of\ blank)}{(OD_{570}\ solvent\ control) - (OD_{570}\ of\ blank)} \times 100$$

Līdzīgā veidā šūnu relatīvo dzīvotspēju procentuāli izsaka katrai šķīdinātāja kontrolei, tās OB dalot ar barotnes kontroles OB (iepriekš no abām vērtībām atņem tukšā parauga OB).

27. Jāizdara trīs neatkarīgi atkārtojumi, katrs no tiem ar trijām replikāta iedobēm (t. i., n=9). Ar katras testējamās ķimikālijas un šķīdinātāja kontroles trijām iedobēm iegūto vidējo aritmētisko katrā neatkarīgajā atkārtojumā izmanto, lai aprēķinātu šūnu relatīvās dzīvotspējas vidējo aritmētisko vērtību. Šūnu dzīvotspējas galīgo vidējo aritmētisko vērtību aprēķina no visiem trijiem neatkarīgajiem atkārtojumiem.

28. Tālāk norādītas šūnu dzīvotspējas robežvērtības tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija), un arī tādu testējamo ķimikāliju identificēšanai, kuras nav jāklasificē kā acīm kairinošas vai nopietnus acu bojājumus izraisošas (ANO GHS / *CLP* nekategorizētās ķimikālijas).

2. tabula

STE testēšanas metodes prognostiskais modelis

Šūnu dzīvotspēja		ANO GHS / *CLP* klasifikācija	Piemērojamība
Pie 5 %	Pie 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Nekategorizēta	Vielas un maisījumi, izņemot: i) ļoti gaistošas vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa ([1]), un ii) cietas ķimikālijas (vielas un maisījumus), kas nav virsmaktīvās vielas vai maisījumi, kuri pilnībā sastāv no virsmaktīvām vielām
≤ 70%	> 70 %	Nav iespējams prognozēt	Nepiemēro
≤ 70%	≤ 70%	1. kategorija	Vielas un maisījumi ([2])

([1]) Maisījumus, kas satur vielas, kuru tvaika spiediens pārsniedz 6 kPa, jāizvērtē piesardzīgi, lai nepieļautu potenciālas bīstamības neprognozēšanu, un pamatojums jādod par katru atsevišķu gadījumu.

([2]) Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti pamatā ar vienkomponenta vielām, lai gan pastāv arī ierobežots daudzums datu par maisījumu testēšanu. Tomēr šī testēšanas metode ir tehniski piemērojama daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Ja šo testēšanas metodi izmanto, lai testētu maisījumu, un testēšanas nolūks ir iegūt datus kādam normatīvajam mērķim, vispirms jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

▼M8

Pieņemamības kritēriji

29. Testēšanas rezultātus uzskata par pieņemamiem, ja ir izpildīti visi zemāk nosauktie kritēriji.

a) (Kultūras barotnei eksponētās) barotnes kontroles optiskajam blīvumam, no kura atņemts tukšā parauga optiskais blīvums, jābūt 0,3 vai lielākam.

b) Šķīdinātāja kontroles dzīvotspējai attiecībā pret barotnes kontroli jābūt 80 % vai lielākai. Ja katrā atkārtojumā izmanto vairāku šķīdinātāju kontroles: lai ar šiem šķīdinātajiem testētās ķimikālijas būtu kvalificējamas, ikvienā no minētajām kontrolēm šūnu dzīvotspējai jābūt lielākai par 80 %.

c) Ar pozitīvo kontroli (0,01 % SLS) iegūtajai šūnu dzīvotspējai jābūt vēsturiskās vidējās vērtības divu standartnoviržu robežās. Pozitīvās kontroles augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības būtu jāatjaunina regulāri, t. i., reizi trijos mēnešos vai ikreiz, kad tests ar pieņemamu rezultātu izdarīts laboratorijā, kur testēšana notiek neregulāri (t. i., retāk nekā reizi mēnesī). Ja laboratorijas veikto eksperimentu nav pietiekami daudz, lai iegūtu statistiski robustu pozitīvo kontroļu sadalījumu, ir pieņemami izmantot metodes izstrādātāja noteiktās augšējās un apakšējās pieņemamības robežvērtības, t. i., vērtības intervālā no 21,1 % līdz 62,3 % atkarībā no izstrādātāja laboratorijas vēsturiskajiem datiem, un pašiem savu sadalījumu izveidot pirmo rutīnas testu laikā.

d) Testējamās ķimikālijas 5 % un 0,05 % koncentrācijā trijos neatkarīgos atkārtojumos iegūtas galīgās šūnu dzīvotspējas standartnovirzei jābūt mazākai nekā 15 %.

Ja viens vai vairāki no šiem kritērijiem nav izpildīti, rezultātus atmet un izdara trīs citus neatkarīgus atkārtojumus.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

30. Pārskatā jāiekļauj dati par katru individuālo mikroiebobi (piem., šūnu dzīvotspējas vērtības) visos atkārtojumos, kā arī jānorāda kopējā vidējā vērtība, standartnovirze un klasifikācija.

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

Testējamā ķimikālija un kontroles vielas

— Vienkomponenta viela: ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījums: iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Agregātstāvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmiskā klase un citas pētījuma veikšanai relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

▼**M8**

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

Testēšanas metodes nosacījumi un procedūras

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotās testēšanas metodes apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās avots, pasāžas numurs un testēšanā izmantoto šūnu konfluence

— Sīkas ziņas par izmantoto testēšanas procedūru

— Izmantoto atkārtojumu un replikātu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas (ja atšķiras no rekomendētajām)

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums

— Ar testējamo ķimikāliju saistītās ekspozīcijas ilgums (ja atšķiras no rekomendētā)

— Testēšanas procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmumpieņemšanas kritēriju apraksts

— Atsauce uz vēsturisko pozitīvo kontroles vidējo vērtību un standartnovirzi (SD)

— Apliecināta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Rezultāti

— Par katru testējamo ķimikāliju un kontroles vielu un par katru testēto koncentrāciju tabulā jānorāda individuālās OD vērtības katrā replikāta mikroiedobē, OD vidējās aritmētiskās vērtības katrā neatkarīgā atkārtojumā, procentuālā šūnu dzīvotspēja katrā neatkarīgā atkārtojumā un procentuālās šūnu dzīvotspējas galīgā vidējā aritmētiskā vērtība un SD, kas aptver trīs atkārtojumus

— Barotnes, šķīdinātāja un pozitīvās kontroles rezultāti pēc piemērotiem pētījuma pieņemamības kritērijiem

— Jebkādas citas novērotās ietekmes apraksts

— Kopējā atvasinātā klasifikācija ar norādi uz izmantoto prognostisko modeli un/vai lēmumpieņemšanas kritēriju

▼**M8**

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: 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* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 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* 22,760-770.

(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* 25,796-809.

(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* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas raksturlielums un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto tādā pat nozīmē kā terminu "konkordantums", ar to saprotot testēšanas metodes pareizo iznākumu īpatsvaru (13).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju izmanto par standartu. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti; ii) strukturāla un funkcionāla līdzība ar testējamās vielas klases vielām; iii) labi zināmas fizikālās un ķīmiskās īpašības; iv) apliecinoši dati par zināmajām ietekmēm un v) vielas zināmajai potencei jāatbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 2. kategorija.

Pseidonegatīvu īpatsvars: pozitīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par negatīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu īpatsvars: negatīvā iznākuma ķimikāliju proporcija, kuras ar testēšanas metodi aplami noteiktas par pozitīvām. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai tādējādi noteiktu, vai šķīdinātājs un testa sistēma mijiedarbojas.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds.

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq$ 10 % (masa/masa) un $<$ 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

▼**M8**

OB: optiskais blīvums.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (10).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (13).

Jutība: tas, cik liela proporcija no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (10).

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes paslikti-nāšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 1. kategorija.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, to vidū šķīdinātājs vai nesējs, ko izmanto ar testējamo ķimikāliju apstrādātajos paraugos un citos kontrolparaugos, un kuru izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā vai nesējā izšķīdinātu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs vai nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (13).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Virsmaktīvā viela: viela, piem., detergents, kas spēj samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M8

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā noteiktā secībā pārskata visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju, katrā pakāpē izmantojot pierādījumu izsvēršanu, lai pirms pārejas uz nākamo pakāpi noteiktu, vai ir pieejams pietiekami daudz informācijas, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu var noteikt, pamatojoties uz esošo informāciju, papildu testēšana nav jāveic. Ja, pamatojoties uz esošo informāciju, testējamās ķimikālijas kairinātājpotenciālu noteikt nevar, ievēro pakāpenisku secīgu procedūru testēšanai ar dzīvniekiem, un to dara tik ilgi, līdz var viennozīmīgi pieņemt lēmumu par klasifikāciju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar mērķi sniegt informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, lai aizsargātu cilvēkus (viņu vidū darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS / *CLP* 1. kategorija: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

ANO GHS / *CLP* 2. kategorija: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas: Ķimikālijas, kas nav klasificētas ANO GHS / *CLP* 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼M8

B.69. **REKONSTRUĒTA, CILVĒKA RADZENEI LĪDZĪGA EPITĒLIJA (*RhCE*) TESTĒŠANAS METODE, KURĀ IDENTIFICĒ ĶIMIKĀLIJAS, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijā (TG) Nr. 492 (2017) aprakstītajam. *Nopietni acu bojājumi* ir acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes pasliktināšanās, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska, saskaņā ar Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizēto sistēmu (ANO GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulu (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP*) ([1]). Saskaņā ar ANO GHS un *CLP acu kairinājums* ir izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnībā atgriezeniskas. Testējamās ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, klasificē ANO GHS un *CLP* 1. kategorijā, bet testējamās ķimikālijas, kas izraisa acu kairinājumu, klasificē ANO GHS un *CLP* 2. kategorijā. Testējamās ķimikālijas, kuras nav klasificētas par tādām, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus, saskaņā ar definīciju ir ķīmiskās vielas, kuras neatbilst priekšnosacījumiem klasificēšanai ANO GHS un *CLP* 1. vai 2. kategorijā (2A vai 2B), t. i., tās tiek uzskatītas par ANO GHS un *CLP* nekategorizētām ķimikālijām.

2. Nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki (TM B.5 (2)). Vispiemērotākās testēšanas metodes izvēle un šīs testēšanas metodes izmantošana jāskata ESAO Vadlīniju par integrētu pieeju nopietnu acu bojājumu un acu kairinājuma testēšanai un novērtēšanai (39) kontekstā.

3. Šajā testēšanas metodē aprakstīta *in vitro* procedūra, pēc kuras var noteikt ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas saskaņā ar ANO GHS un *CLP* izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Tajā izmanto rekonstruētu cilvēka radzenei līdzīgu epitēliju (*RhCE*), kura īpašības ļoti līdzinās cilvēka radzenes epitēlija histoloģiskajām, morfoloģiskajām, bioķīmiskajām un fizioloģiskajām īpašībām. Vēl četras *in vitro* testēšanas metodes ir apstiprinātas, uzskatāmas par zinātniski derīgām un pieņemtas kā TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) un B.68 (6), lai noteiktu cilvēka veselības beigupunktam atbilstošos nopietnos acu bojājumus / acu kairinājumu.

4. Šajā testēšanas metodē iekļauti divi apstiprināti testi, kuros izmanto komerciāli pieejamus *RhCE* modeļus. Validācijas pētījumi acu kairinājuma / nopietnu acu bojājumu novērtēšanai veikti (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) ar EpiOcular™ acu kairinājuma testu (*EIT*) un SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlija (*HCE*) acu kairinājuma testu (*EIT*). Katrā no šiem testiem par testa sistēmu izmanto komerciāli pieejamas *RhCE* audu konstrukcijas, tālāk tekstā tās

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

sauktas par validētām references metodēm: attiecīgi *VRM1* un *VRM2*. No šiem validācijas pētījumiem un to neatkarīgajiem salīdzinošajiem izvērtējumiem (9)(12) secināja, ka ar EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* iespējams pareizi identificēt ķimikālijas (vielas un maisījumus), kuras nav jāklasificē un jāmarķē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus saskaņā ar ANO GHS, un testus ieteica kā zinātniski derīgus šim nolūkam (13).

5. Patlaban ir vispārpieņemts, ka tuvākajā nākotnē neviena atsevišķa *in vitro* testēšanas metode nevarēs pilnībā aizstāt Dreiza [*Draize*] *in vivo* acu testu (2)(14) un prognozēt visas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas dažādām ķimikāliju klasēm. Tomēr Dreiza acu testu varētu būt iespējams pilnībā aizstāt, (pakāpjveida) testēšanas stratēģijā stratēģiski kombinējot vairākas alternatīvas testēšanas metodes, piem., augšupēju/lejupēju pieeju (15). Augšupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, paredzams, ka ķimikālija neizraisīs tādu acu kairinājumu, ka tā būtu jāklasificē, savukārt lejupējā pieeja (15) ir izstrādāta gadījumiem, kad, pamatojoties uz esošo informāciju, ķimikālija izraisīs nopietnus acu bojājumus. EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* ieteicams izmantot tādā testēšanas stratēģijā kā *Scott et al.* ierosinātā augšupējā/-lejupējā pieeja, piemēram, par sākotnējo posmu augšupējā pieejā vai kā vienu no pēdējiem posmiem lejupējā pieejā, tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķīmiskās vielas) bez papildu testēšanas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (15). Taču EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* nav paredzēti ANO GHS / *CLP* 1. kategorijas (nopietni acu bojājumi) un ANO GHS / *CLP* 2. kategorijas (acu kairinājums) atšķiršanai. Šī diferenciācija būs jānosaka citā testēšanas stratēģijas pakāpē (15). Tāpēc testējamā ķimikālija, kura ar EpiOcular™ *EIT* vai SkinEthic™ *HCE EIT* identificēta par tādu, kas jāklasificē kā acu kairinājumu / nopietnus acu bojājumus izraisoša, jātestē papildus (*in vitro* un/vai *in vivo*), lai nonāktu pie galīgā secinājuma (ANO GHS / *CLP* nekategorizēta, 2. kategorijas vai 1. kategorijas ķimikālija), izmantojot, piem., TM B.47, B.48, B.61 vai B.68.

6. Šajā testēšanas metodē aprakstīta procedūra, ko izmanto, lai izvērtētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm, pamatojoties uz tās spēju izraisīt citotoksicitāti *RhCE* audu konstrukcijā, ko nosaka ar MTT ķīmisko analīzi (16) (sk. 21. punktu). *RhCE* audu dzīvotspēju pēc eksponēšanas testējamai ķimikālijai nosaka salīdzinājumā ar audiem, kas apstrādāti ar negatīvās kontroles vielu (% dzīvotspējas), pēc tam to izmanto, lai prognozētu testējamās ķimikālijas potenciālo bīstamību acīm.

7. Lai saskaņā ar ESAO Vadlīniju Nr. 34 (18) principiem būtu vieglāk validēt jaunus vai grozītus in vitro *RhCE* testus, kas līdzinās EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT*, un lai ESAO TG 492 būtu iespējams savlaicīgi grozīt ar mērķi tajā iekļaut šos testus, ir pieejami veiktspējas standarti (17). Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar veiktspējas standartiem, datu savstarpējā atzīšana (*MAD*) saskaņā ar ESAO nolīgumu būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā.

DEFINĪCIJAS

8. Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

▼M8

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

9. Šīs testēšanas metodes pamatā ir komerciālas trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijas, ko ražo, izmantojot primāros cilvēka epidermas keratinocītus (t. i., EpiOcular™ *OCL*-200) vai imortalizētas cilvēka radzenes epitēlija šūnas (t. i., SkinEthic™ *HCE/S*). EpiOcular™ *OCL*-200 un SkinEthic™ *HCE/S RhCE* audu konstrukcijas ir līdzīgas *in vivo* radzenes epitēlija trīsdimensiju struktūrai, un tās ražo no pētāmās sugas šūnām (19)(20). Turklāt ar testiem tieši nosaka citotoksicitāti, ko izraisa ķimikālijas iekļūšana cauri radzenei un šūnu un audu bojājumu rašanās, pēc tam citotoksiskā atbildreakcija nosaka nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējo iznākumu *in vivo*. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi (sk. 20. punktu), taču citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķimikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā, kas neatkarīgi no audu bojājumu pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, ir̄ts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze.

10. Šīs testēšanas metodes pamatā esošajā validēšanas pētījumā testētas ļoti daudzas ķimikālijas, aptverot ļoti dažādus ķīmisko vielu veidus, ķīmisko vielu klases, molekulmasas, LogP, ķīmiskās struktūras utt. EpiOcular™ *EIT* validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 113 ķimikālijas, saskaņā ar ESAO *QSAR* instrumentu kopuma analīzi aptverot 95 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8). Vairākums šo ķimikāliju bija vienkomponenta vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas daudzkomponentu vielas (tostarp 3 homopolimēri, 5 kopolimēri un 10 kvazipolimēri). 113 testēto ķimikāliju sadalījums pēc agregātstāvokļa un ANO GHS / *CLP* kategorijām bija šāds: 131. kategorijas šķidrumi, 151. kategorijas cietvielas, 6 2A kategorijas šķidrumi, 102A kategorijas cietvielas, 7 2B kategorijas šķidrumi, 7 2B kategorijas cietvielas, 27 nekategorizēti šķidrumi un 28 nekategorizētas cietvielas (8). SkinEthic™ *HCE EIT* validēšanas datubāzē kopumā bija ietvertas 200 ķimikālijas, aptverot 165 dažādas organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11). Vairākums šo ķimikāliju bija vienkomponenta vielas, taču pētījumā bija iekļautas arī vairākas daudzkomponentu vielas (tostarp 10 polimēri). 200 testēto ķimikāliju sadalījums pēc agregātstāvokļa un ANO GHS / *CLP* kategorijām bija šāds: 271. kategorijas šķidrumi, 241. kategorijas cietvielas, 192A kategorijas šķidrumi, 102A kategorijas cietvielas, 9 2B kategorijas šķidrumi, 8 2B kategorijas cietvielas, 50 nekategorizēti šķidrumi un 53 nekategorizētas cietvielas (10)(11).

11. Šī testēšanas metode attiecas uz vielām un maisījumiem, kā arī uz cietām vielām, šķidrumiem, puscietām vielām un vaskiem. Šķidrumi var būt ūdens vai neūdens šķīdumi; cietas vielas var būt gan ūdenī šķīstošas, gan nešķīstošas. Ja iespējams, cietas vielas pirms aplicēšanas jāsamaļ smalkā pulverī; nekāda cita priekšapstrāde paraugam nav vajadzīga. Validēšanas pētījumā nav novērtētas gāzes un aerosoli. Kaut arī domājams, ka vispār ir iespējams tos testēt ar *RhCE* tehnoloģiju, ar pašreizējo testēšanas metodi gāzes un aerosolus testēt nevar.

12. Testējamās ķimikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un testējamās ķimikālijas, kas spēj tiešā veidā reducēt vitālo krāsvielu MTT (par MTT formazānu), var traucēt audu dzīvotspējas mērījumiem, un korekcijai jāizmanto pielāgotas kontroles. Iespējami nepieciešamo pielāgoto kontroļu veids atšķirsies atkarībā no testējamās ķimikālijas radītās interferences veida un MTT formazāna kvantitatīvai noteikšanai izmantotās procedūras (sk. 36.–42. punktu).

▼**M8**

13. Pirmsvalidēšanas (21)(22) un pilnās validēšanas (8)(10)(11) pētījumos iegūtie rezultāti pierādījuši, ka EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* ir izmantojams laboratorijās, kurās iepriekš nav veikta ķīmiskā analīze, un tie ir reproducējami tajā pašā un citās laboratorijās. Pamatojoties uz šiem pētījumiem, prognožu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no EpiOcular™ *EIT* no iegūtajiem datiem par 113 ķimikālijām, ir aptuveni 95 % tajā pašā laboratorijā un 93 % citās laboratorijās. Prognožu konkordantuma reproducējamības līmenis, ko var sagaidīt no SkinEthic™ *HCE EIT* iegūtajiem datiem par 120 ķimikālijām, ir aptuveni 92 % tajā pašā laboratorijā un 95 % citās laboratorijās.

14. EpiOcular™ *EIT* var izmantot tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (8) iegūtos datus, EpiOcular™ *EIT* vispārējā pareizība ir 80 % (no datiem par 112 ķimikālijām), jutība ir 96 % (no datiem par 57 ķimikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 4 % (no datiem par 57 ķimikālijām), specifiskums ir 63 % (no datiem par 55 ķimikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 37 % (no datiem par 55 ķimikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu. Pētījumā, kurā ar EpiOcular™ *EIT* testēja 97 šķidrus agroķīmijas preparātus, pierādīja, ka šā veida maisījumu testēšanas metodes veiktspēja ir līdzīga validēšanas pētījuma veiktspējai (23). 97 preparātu sadalījums bija šāds: 211. kategorijas, 192A kategorijas, 142B kategorijas un 43 nekategorizēti, kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS klasifikācijas sistēmu atbilstoši truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14). Ieguva vispārējo pareizību 82 % (no datiem par 97 preparātiem), jutību 91 % (no datiem par 54 preparātiem), pseidonegatīvu īpatsvaru 9 % (no datiem par 54 preparātiem), specifiskumu 72 % (no datiem par 43 preparātiem) un pseidopozitīvu īpatsvaru 28 % (no datiem par 43 preparātiem) (23).

15. SkinEthic™ *HCE EIT* var izmantot tādu ķimikāliju identificēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus. Ņemot vērā validēšanas pētījumā (10)(11) iegūtos datus, SkinEthic™ *HCE EIT* vispārējā pareizība ir 84 % (no datiem par 200 ķimikālijām), jutība ir 95 % (no datiem par 97 ķimikālijām), pseidonegatīvu īpatsvars ir 5 % (no datiem par 97 ķimikālijām), specifiskums ir 72 % (no datiem par 103 ķimikālijām) un pseidopozitīvu īpatsvars ir 28 % (no datiem par 103 ķimikālijām), salīdzinot ar truša acu *in vivo* references testa datiem (TM B.5) (2)(14), kas klasificēti saskaņā ar ANO GHS un *CLP* klasifikācijas sistēmu.

16. Ar abiem *RhCE* testiem vielām vai maisījumiem iegūtais pseidonegatīvu īpatsvars atbilst 12 % kopējās varbūtības, ka atkārtotā testēšanā ar *in vivo* Dreiza acu testu ķimikālijas tiek identificētas kā ANO GHS un *CLP* 2. kategorijas vai ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas; tā iemesls ir metodei raksturīgā mainība viena testa ietvaros (24). Ar abām *RhCE* testēšanas metodēm vielām vai maisījumiem iegūtajam pseidopozitīvu īpatsvaram šīs testēšanas metodes kontekstā nav būtiskas nozīmes, jo, izmantojot pierādījumu izsvēršanu pakāpjveida testēšanas stratēģijā, visas testējamās

▼M8

ķimikālijas, kuras rada audu dzīvotspēju, kas atbilst noteiktajām robežvērtībām vai ir mazāka par tām (sk. 44. punktu), atkarībā no regulatīvajām prasībām būs jātestē papildus ar citām *in vitro* testēšanas metodēm vai, ja citas iespējas nebūtu, ar trušiem. Šīs testēšanas metodes var izmantot visu veidu ķimikālijām, negatīvu rezultātu pieņemot par norādi, ka ķimikālija nav jāklasificē kā tāda, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizēta). Pirms EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* izmantošanas klasificēšanas shēmās, kas nav ANO GHS / *CLP*, jākonsultējas ar attiecīgajām regulatīvajām iestādēm.

17. Šīs testēšanas metodes ierobežojums ir tāds, ka ar to nevar atšķirt acu kairinājumu / atgriezenisku ietekmi uz acīm (2. kategorija) no nopietniem acu bojājumiem / neatgriezeniskas ietekmes uz acīm (1. kategorija), kā noteikts ANO GHS un *CLP*, nedz arī acu kairinātājus (fakultatīvā 2A kategorija) no viegliem acu kairinātājiem (fakultatīvā 2B kategorija), kā noteikts ANO GHS (1). Šiem nolūkiem nepieciešama papildu testēšana ar citām *in vitro* testēšanas metodēm.

18. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([1]), bez sasaistes ar *RhCE* testēšanas metodes pielietojamību vielu un/vai maisījumu testēšanā.

TESTA PRINCIPS

19. Testējamo ķimikāliju vietēji aplicē uz vismaz divām trīsdimensiju *RhCE* audu konstrukcijām, un audu dzīvotspēju mēra pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas laika. *RhCE* audus rekonstruē no primāriem cilvēka epidermas keratinocītiem vai imortalizētām cilvēka radzenes epitēlija šūnām, kas kultivētas vairākas dienas, tā lai veidotos stratificēts, labi diferencēts plakans epitēlijs, kas ir morfoloģiski līdzīgs epitēlijam cilvēka radzenē. EpiOcular™ *RhCE* audu konstrukciju veido vismaz 3 dzīvotspējīgi šūnu slāņi un nekeratinizēta virsma, un tai piemīt radzenei līdzīga struktūra, kas ir analoga struktūrai *in vivo*. SkinEthic™ *HCE RhCE* audu konstrukciju līdzīgi normālam cilvēka radzenes epitēlijam veido vismaz 4 dzīvotspējīgi šūnu slāņi, to vidū cilindriskās bazālās šūnas, pārejas spārnveida šūnas un virspusējās plakanās šūnas (20)(26).

20. Ķimikālijas izraisīti nopietni acu bojājumi / acu kairinājums, kas *in vivo* izpaužas galvenokārt kā radzenes apduļķošanās, irīts, konjunktīvas apsārtums un/vai konjunktīvas hemoze, ir rezultāts virknei notikumu, kas sākas ar ķimikālijas iekļūšanu cauri radzenei un/vai konjunktīvai un šūnu bojājumu rašanos. Šūnu bojājumus var izraisīt vairāki iedarbības veidi: šūnas membrānas līze (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju izraisīta); makromolekulu (īpaši proteīnu) koagulācija (piem., virsmaktīvo vielu, organisku šķīdinātāju, sārmu un skābju izraisīta); lipīdu pārziepošanās (piem., sārmu izraisīta); alkilēšana vai cita kovalenta mijiedarbība ar makromolekulām (piem., balināšanas līdzekļu, peroksīdu un alkilētāju izraisīta) (15)(27)(28). Tomēr pierādīts, ka citotoksicitātei ir svarīga vai pat primāra mehānistiska nozīme ķimikālijas izraisītas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma vispārējās atbildreakcijas noteikšanā neatkarīgi no audu bojājumu

([1]) 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

▼M8

pamatā esošiem fizikāli ķīmiskajiem procesiem (29)(30). Turklāt ķimikālijas potenciālu izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu galvenokārt nosaka sākotnējā bojājuma apjoms (31), kas korelē ar šūnu mirstības apjomu (29) un sekojošo atbildreakciju un iespējamo iznākumu apjomu (32). Tādējādi pavisam viegli kairinātāji parasti ietekmē tikai virspusējo radzenes epitēliju, viegli un vidēji smagi kairinātāji bojā galvenokārt epitēliju un virspusējo stromu, bet smagi kairinātāji bojā epitēliju, dziļo stromu un reizēm radzenes endotēliju (30)(33). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējas mērīšana, ko pēc vietējas eksponēšanas testējamai ķimikālijai veic, lai noteiktu ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), pamatojas uz pieņēmumu, ka visas ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus vai acu kairinājumu, radzenes epitēlijā un/vai konjunktīvā izraisīs citotoksicitāti.

21. *RhCE* audu dzīvotspēju ierasts mērīt pēc audu dzīvotspējīgo šūnu ierosinātas vitālās krāsvielas MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds; *CAS* Nr. 298-93-1] fermentatīvās pārvēršanās par zilas krāsas MTT formazāna sāli, kura daudzumu kvantitatīvi nosaka audu ekstraktā (16). Par ķimikālijām, kuras nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķimikālijas), nosaka tādas ķimikālijas, kas nesamazina audu dzīvotspēju zem noteiktas robežvērtības (t. i., audu dzīvotspēja > 60 % EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EITL* testā ([1]) vai > 50 % SkinEthic™ *HCE EITS* testā ([2])) (sk. 44. punktu).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

22. Pirms *RhCE* testu regulāras izmantošanas normatīviem mērķiem laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, pareizi prognozējot 1. tabulā norādītās piecpadsmit standartķimikālijas. Šīs ķimikālijas atlasītas no *VRM* validēšanas pētījumos izmantotajām ķimikālijām (8)(10)(11). Atlasē iespējamajā apjomā iekļautas ķimikālijas: i) ar atšķirīgu agregātstāvokli; ii) kas aptver visas nopietnu acu bojājumu / acu kairinājuma atbildreakcijas *in vivo* atbilstoši augstas kvalitātes rezultātiem, kas iegūti truša acu *in vivo* references testā (TM B.5) (2)(14) un ANO GHS klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2A, 2B kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas) (1) un *CLP* klasifikācijas sistēmā (t. i., 1., 2. kategorijas vai nekategorizētas ķimikālijas); iii) kas aptver klasifikācijas atšķirīgos faktorus *in vivo* (24)(25); iv) kas atbilst validēšanas pētījumā izmantotajām ķimikāliju klasēm (8)(10)(11); v) kas plaši aptver organiskās funkcionālās grupas (8)(10)(11); vi) kuru ķīmiskā struktūra ir precīzi noteikta (8)(10)(11); vii) kurām ir krāsa un/vai kas ir tiešas MTT reducētājas; viii) ar kurām to validēšanas laikā ar *RhCE* testēšanas metodēm ieguva reproducējamus rezultātus; ix) kuras to validēšanas pētījumu laikā tika pareizi prognozētas ar *RhCE* testēšanas metodēm; x) kas aptver visas atbildreakcijas *in vitro* atbilstoši augstas kvalitātes *RhCE* testēšanas metožu datiem (dzīvotspēja no 0 līdz 100 %); xi) kas ir komerciāli pieejamas; xii) kuru lietošana nav saistīta ar pārlieku augstām iegādes un/vai atkritumu apsaimniekošanas izmaksām. Gadījumos, kad kāda no norādītajām ķimikālijām nav pieejama vai nav izmantojama citu pamatotu iemeslu dēļ, var izmantot citu ķimikāliju, kas atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, piem., ķimikāliju, kas izmantota *VRM* validēšanai. Šādas atkāpes jāpamato.

([1]) *EITL*: *EIT* šķidrumiem, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.
([2]) *EITS*: *EIT* cietvielām, ja izmanto SkinEthic™ *HCE*.

▼**M8**

1. tabula

Standartķimikāliju saraksts

Ķīmiskais nosaukums	*CAS* Nr.	Organiskā funkcionālā grupa ([1])	Agregātstāvoklis	*VRM1* dzīvotspēja (%) ([2])	*VRM2* dzīvotspēja (%) ([3])	*VRM* prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
***In vivo* 1. kategorija** ([4])								
Metiltioglikolāts	2365-48-2	Karbonskābes esteris; tiospirts	Šķidrs	10,9±6,4	5,5±7,4	Nav iespējams prognozēt	Jā (spēcīgs)	Nē
Hidroksietilakrilāts	818-61-1	Akrilāts; spirts	Šķidrs	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,5-Dimetil-2,5-heksāndiols	110-03-2	Spirts	Ciets	2,3±0,2	0,2±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
Nātrija oksalāts	62-76-0	Oksokarbonskābe	Ciets	29,0±1,2	5,3±4,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo* 2A kategorija** ([4])								
2,4,11,13-Tetraazatetradekāndiimidamīds, *N*,*N*″-bis(4-hlorfenil)-3,12-diimino-, di-*D*-glikonāts (20 %, ūdens) ([6])	18472-51-0	Aromātiskais heterocikliskais halogenīds; arilhalogenīds; dihidroksilgrupa; guanidīns	Šķidrs	4,0±1,1	1,3±0,6	Nav iespējams prognozēt	Nē	Jā (vājš)
Nātrija benzoāts	532-32-1	Arils; karbonskābe	Ciets	3,5±2,6	0,6±0,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo 2B* kategorija** ([4])								
Dietiltoluamīds	134-62-3	Benzamīds	Šķidrs	15,6±6,3	2,8±0,9	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
2,2-Dimetil-3-metilēnbiciklo [2.2.1] heptāns	79-92-5	Alkāns, sazarots ar trešējo oglekli; alkēns; bicikloheptāns; karbocikli ar tiltiņu saturošu gredzenu; cikloalkāns	Ciets	4,7±1,5	15,8±1,1	Nav iespējams prognozēt	Nē	Nē
***In vivo* nekategorizētas** ([4])								
1-Etil-3-metilimidazolija etilsulfāts	342573-75-5	Alkoksils; amonija sāls; arils; imidazols; sulfāts	Šķidrs	79,9±6,4	79,4±6,2	Nekategor.	Nē	Nē

▼**M8**

Ķīmiskais nosaukums	*CAS* Nr.	Organiskā funkcionālā grupa (1)	Agregātstāvoklis	*VRM1* dzīvotspēja (%) (2)	*VRM2* dzīvotspēja (%) (3)	*VRM* prognoze	MTT reducētājs	Krāsas interf.
Dikaprililēteris	629-82-3	Alkoksils; ēteris	Šķidrs	97,8±4,3	95,2±3,0	Nekategor.	Nē	Nē
Piperonila butoksīds	51-03-6	Alkoksils; benzdioksols; benzils; ēteris	Šķidrs	104,2±4,2	96,5±3,5	Nekategor.	Nē	Nē
Polietilēnglikola (PEG-40) hidrogenēta rīcineļļa	61788-85-0	Acilals; spirts; alils; ēteris	Viskozs	77,6±5,4	89,1±2,9	Nekategor.	Nē	Nē
1-(4-Hlorfenil)-3-(3,4-dihlorfenil)urīnviela	101-20-2	Aromātiskais heterocikliskais halogenīds; arilhalogenīds; urīnvielas atvasinājumi	Ciets	106,7±5,3	101,9±6,6	Nekategor.	Nē	Nē
2,2′-Metilēn-bis-(6-(2*H*-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenols)	103597-45-1	Alkāns, sazarots ar četraizvietoto oglekli; saplūdusi karbocikliskā aromātviela; saplūduši piesātinātie heterocikli; prekursoru hinoīdu savienojumi; *terc*-butils	Ciets	102,7±13,4	97,7±5,6	Nekategor.	Nē	Nē
Kālija tetrafluorborāts	14075-53-7	Neorganisks sāls	Ciets	88,6±3,3	92,9±5,1	Nekategor.	Nē	Nē

Saīsinājumi:

CAS Nr. = *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs; AMO GHS = Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (1); *VRM1* = validēta references metode, EpiOcular™ *EIT*; *VRM2* = validēta references metode, SkinEthic™ *HCE EIT*; Krāsas interf. = krāsas interference ar MTT formazāna standartabsorbcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu.

(1) Organiskā funkcionālā grupa piešķirta atbilstoši ESAO instrumentu kopuma 3.1. versijas ieligzdotai analīzei (8).

(2) Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar EpiOcular™ *EIT* iegūti *EURL ECVAM* / *Cosmetics Europe* acu kairinājuma validēšanas pētījumā (*EIVS*) (8).

(3) Pamatojoties uz rezultātiem, kas ar SkinEthic™ *HCE EIT* iegūti validēšanas pētījumā (10)(11).

(4) Pamatojoties uz truša acu *in vivo* testa (TM B.5 / ESAO TG 405) (2)(14) rezultātiem un izmantojot ANO GHS sistēmu.

(5) Pamatojoties uz rezultātiem, kas iegūti *CEFIC* konsorcija *in vitro* acu kairinājuma testēšanas stratēģijas (*CON4EI*) pētījumā.

(6) Klasificēšana 2A vai 2B kategorijā ir atkarīga no tā, kā interpretē ANO GHS kritēriju, ar ko šīs divas kategorijas nošķir, t. i., lai ķimikāliju klasificētu 2A kategorijā, 7. dienā ietekmei jābūt novērojamai 1 no 3 dzīvniekiem vai 2 no 3 dzīvniekiem. *In vivo* pētījums aptvēra 3 dzīvniekus. Visi beigupunkti, izņemot radzenes apduļķojumu vienam dzīvniekam, līdz 7. dienai vai agrāk atgriezās kaitējuma nulles līmenī. Dzīvniekam, kurš līdz 7. dienai nebija pilnībā atlabis, 7. dienā radzenes apduļķojuma rādītājs bija 1, taču ietekme pilnībā pazuda 9. dienā.

23. Ieteicams, lai kompetences testēšanas ietvaros lietotāji pēc audu saņemšanas verificētu šo audu barjerfunkcijas, kā precizējis *RhCE* audu konstrukcijas ražotājs (sk. 25., 27. un 30. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja audi sūtīti no tālienes / sūtīšana aizņēmusi ilgu laiku. Kad tests ir sekmīgi ieviests un apgūts un tā izmantošanas prasme pierādīta, šādu verifikāciju vairs nav nepieciešams veikt katru reizi. Tomēr, ja testu izmanto parastajā praksē, barjerfunkciju novērtēšanu ieteicams turpināt regulāri.

▼M8

PROCEDŪRA

24. Testi, uz kuriem pašlaik attiecas šī testēšanas metode, ir zinātniski derīgie EpiOcular™ *EIT* un SkinEthic™ *HCE EIT* (9)(12)(13), ko dēvē par validēto references metodi (attiecīgi *VRM1* un *VRM2*). *RhCE* testēšanas metodēm ir pieejamas standartprocedūras, kas jāizmanto, ieviešot un izmantojot testēšanas metodes laboratorijā (34)(35). Nākamajos punktos un 2. papildinājumā aprakstītas *RhCE* testu galvenās sastāvdaļas un procedūras.

RHCE TESTĒŠANAS METODES KOMPONENTI

Vispārīgi nosacījumi

25. Lai rekonstruētu radzenei līdzīga epitēlija trīsdimensiju audus, jāizmanto attiecīgas cilvēka šūnas, kam jāsastāv no pieaugoši stratificētām, bet ne pārragotām šūnām. *RhCE* audu konstrukciju gatavo insertos ar porainu sintētisku membrānu, caur kuru šūnām var piekļūt barības vielas. Rekonstruētajā radzenei līdzīgajā epitēlijā jābūt vairākiem dzīvotspējīgu, nekeratinizētu epitēlija šūnu slāņiem. *RhCE* audu konstrukcijas epitēlija virsmai jābūt tiešā saskarē ar gaisu, lai būtu iespējama tieša vietēja eksponēšana testējamajām ķimikālijām līdzīgi tam, kā *in vivo* tiktu eksponēts radzenes epitēlijs. *RhCE* audu konstrukcijai jāveido pietiekami spēcīga funkcionāla barjera, lai aizturētu citotoksisko etalonvielu, piem., *Triton* X-100 vai nātrija dodecilsulfāta (SDS), ātru penetrāciju. Barjerfunkcija būtu uzskatāmi jāpierāda, un šo funkciju iespējams novērtēt, vai nu nosakot, kāds ekspozīcijas laiks vajadzīgs, lai pēc tam, kad konkrētā noteiktā koncentrācijā aplicēta etalonviela (piem., 100 µl 0,3 % (tilp./tilp.) *Triton* X-100), par 50 % samazinātos audu dzīvotspēja (ET_{50}), vai nosakot, pie kādas koncentrācijas etalonviela pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu ilgas apstrādes ar 50 µl SDS) par 50 % samazina audu dzīvotspēju (IC_{50}) (sk. 30. punktu). *RhCE* audu konstrukcijas aizturošajām īpašībām jānovērš testējamās ķimikālijas nokļūšana pāri dzīvotspējīgo audu malai, jo tā dēļ var tikt nepareizi modelēta faktiskā iedarbība uz radzeni. *RhCE* audu konstrukcijas izveidē izmantotās cilvēka šūnas nedrīkst būt kontaminētas ar baktērijām, vīrusiem, mikoplazmu vai sēnītēm. Piegādātājam jāpārbauda audu konstrukcijas sterilitāte, lai pārliecinātos, ka nav kontaminācijas ar sēnītēm un baktērijām.

Funkcionāli nosacījumi

Dzīvotspēja

26. Audu dzīvotspējas kvantitatīvai noteikšanai izmanto MTT ķīmisko analīzi (16). *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm, ko pēc tam no audiem ekstrahē ar izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju). Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (optiskā blīvuma jeb OB) mērījumu vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (36). Tīra ekstrakcijas šķīdinātāja OB jābūt pietiekami zemam, t. i., OB < 0,1. *RhCE* audu konstrukcijas lietotājiem jānodrošina, ka katra izmantotā *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst negatīvajai kontrolei definētajiem kritērijiem.

▼M8

Negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazoni attiecīgajām *VRM* ir norādīti 2. tabulā. *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas lietotājam par negatīvās kontroles apstiprināšanas kritēriju jāizmanto 2. tabulā norādītie negatīvās kontroles OB diapazoni. Testēšanas pārskatā jābūt dokumentētam, ka ar negatīvās kontroles vielu apstrādātie audi kultūrā ir stabili (nodrošina līdzīgus audu dzīvotspējas mērījumus) visas testa ekspozīcijas laikā. Audu ražotājam audu partijas izlaides kvalitātes kontroles ietvaros jāveic līdzīga procedūra, taču šajā gadījumā var būt spēkā no 2. tabulā norādītajiem atšķirīgi apstiprināšanas kritēriji. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka negatīvās kontroles OB vērtību pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība) (*QC* testēšanas metodes apstākļos).

2. tabula

Testa lietotājiem paredzētie negatīvās kontroles optiskā blīvuma vērtību pieņemamības diapazoni

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ *EIT* (*OCL*-200) – *VRM1* (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ *HCE EIT* (*HCE/S*) – *VRM2* (gan šķidru, gan cietu vielu protokoliem)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Šajā pieņemamības robežvērtībā ņemta vērā iespēja, ka nosūtīšana/glabāšana bijusi ilgstoša (piemēram, > 4 dienas), un pierādīts, ka tas nav ietekmējis testēšanas metodes veiktspēju (37).

Barjerfunkcija

27. *RhCE* audu konstrukcijai jābūt pietiekami biezai un noturīgai, lai aizturētu citotoksisku etalonvielu ātru penetrāciju, ko nosaka pēc ET_{50} (*Triton* X-100) vai pēc IC_{50} (SDS) (3. tabula). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/pārdevējam, kad tas piegādā audus gala lietotājam, jāpierāda katras izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partijas barjerfunkcija (sk. 30. punktu).

Morfoloģija

28. *RhCE* audu konstrukcijas histoloģiskā izmeklējumā jāpierāda līdzība cilvēka radzenes epitēlija struktūrai (jābūt vismaz 3 slāņiem dzīvotspējīgu epitēlija šūnu un nekeratinizētai virsmai). Attiecīgajām *VRM* izstrādātājs/piegādātājs ir izveidojis atbilstošu morfoloģiju, tāpēc testēšanas metodes lietotājam tā nav atkārtoti jāpierāda katrai izmantojamajai audu partijai.

Reproducējamība

29. Testēšanas metodes pozitīvās un negatīvās kontroles rezultātiem uzskatāmi jāparāda to reproducējamība laika gaitā.

*Kvalitātes kontrole (*QC*)*

30. *RhCE* audu konstrukciju drīkst izmantot tikai tad, ja izstrādātājs/piegādātājs pierāda, ka ikviena izmantojamās *RhCE* audu konstrukcijas partija atbilst definētajiem produkcijas izlaides kritērijiem, no kuriem svarīgākie ir dzīvotspēja (26. punkts) un barjerfunkcija (27. punkts). *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam jānosaka ar ET_{50} vai IC_{50} mērītas (sk. 25. un 26. punktu) barjerfunkcijas pieņemamības diapazons (augšējā un apakšējā robežvērtība). ET_{50} un IC_{50} pieņemamības diapazons, ko *RhCE* audu konstrukciju izstrādātājs/piegādātājs izmanto kā *QC* partijas izlaides kritēriju (izmanto *VRM*), ir norādīts 3. tabulā. *RhCE* audu konstrukcijas izstrādātājam/piegādātājam dati, kas pierāda atbilstību visiem produkcijas izlaides kritērijiem, jādara pieejami testēšanas metodes lietotājiem, lai tie šo informāciju varētu iekļaut testēšanas pārskatā. Tikai ar visiem šiem produkcijas izlaides kritērijiem atbilstošiem audiem iegūti rezultāti. ir pieņemami tādu ķimikāliju ticamai prognozēšanai, kuras saskaņā ar ANO GHS / *CLP* nav jāklasificē un jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas.

▼M8

3. tabula

Partiju izlaides *QC* kritērijs

Tests	Apakšējā pieņemamības robežvērtība	Augšējā pieņemamības robežvērtība
EpiOcular™ *EIT* (*OCL*-200) – *VRM1* (100 µl 0,3 % (tilpums/tilpums) *Triton* X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ *HCE EIT* (*HCE/S*) – *VRM2* (30 minūšu ilga apstrāde ar 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu aplicēšana

31. Katrai testējamai ķimikālijai un katrai kontroles vielai katrā izpildes reizē vajadzīgi vismaz divi audu replikāti. Izmanto divus atšķirīgus apstrādes protokolus: vienu šķidrām testējamajām ķimikālijām un vienu cietām testējamajām ķimikālijām (34)(35). Atbilstoši abām metodēm un protokoliem pirms testējamo ķimikāliju aplicēšanas audu konstrukcijas virsma jāsamitrina ar kalciju un magniju nesaturošu Dulbeko fosfātu fizioloģisko buferšķīdumu (Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS), lai atdarinātu cilvēka acs mitruma apstākļus. Audu apstrādi sāk, tos eksponējot testējamai ķimikālijai (ķimikālijām) un kontroles vielām. Atbilstoši abiem apstrādes protokoliem abās *VRM* testējamā ķimikālija vai kontroles viela uz epitēlija virsmas vienmērīgā slānī jāaplicē pietiekamā daudzumā, taču izvairoties no pārmērīgas devas (sk 32. un 33. punktu) (2. papildinājums).

32. Testējamās ķimikālijas, kas 37 °C vai zemākā temperatūrā ir pilināmas ar pipeti (ja nepieciešams, izmantojot pozitīvo maināmo uzgaļu virzuļpipeti), saskaņā ar *VRM* uzskata par šķidrumiem, pārējos gadījumos tās uzskatāmas par cietām vielām (sk 33. punktu). Saskaņā ar *VRM* šķidras testējamās ķimikālijas vienmērīgi uzklāj audu virsmai (t. i., aplicē vismaz 60 µl/cm^2) (sk. 2. papildinājumu, (33)(34)). Lai nodrošinātu audu pareizu devu, ciktāl iespējams, jāizvairās no kapilārās iedarbības (virsmas spraiguma efekta), kas var rasties insertam (uz audu virsmas) aplicētā nelielā tilpuma dēļ. Ar šķidrām testējamajām ķimikālijām apstrādātos audus 30 minūtes inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM). Ekspozīcijas laika beigās šķidrā testējamā ķimikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķimikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*. Tikai saskaņā ar *VMR1* pēcekspozīcijas inkubēšanai svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos jānotiek pirms MTT ķīmiskās analīzes (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).

33. Testējamās ķimikālijas, kas līdz 37 °C temperatūrā nav pilināmas ar pipeti, saskaņā ar *VRM* uzskata par cietām vielām. Aplicējamajam testējamās ķimikālijas daudzumam jābūt pietiekamam, lai pilnībā nosegtu audu virsmu, t. i., jāaplicē vismaz 60 mg/cm^2 (2. papildinājums). Ja iespējams, cietas vielas jātestē smalka pulvera veidā. Ar cietām testējamajām ķimikālijām apstrādātos audus iepriekš noteiktu laiku (atkarībā no izmantotās *VRM*) inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ekspozīcijas laika beigās cietā testējamā ķimikālija un kontroles vielas no audu virsmas rūpīgi

▼M8

jānoņem, istabas temperatūrā intensīvi skalojot ar Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošu DPBS. Nākamā darbība pēc skalošanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes ir pēcekspozīcijas iegremdēšana svaigā istabas temperatūras barotnē (lai atbrīvotos no audos absorbējušās testējamās ķimikālijas) uz iepriekš noteiktu laiku, kas atšķiras atkarībā no izmantotās *VRM*, un pēcekspozīcijas inkubēšana svaigā barotnē standarta kultivēšanas apstākļos (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)).

34. Katrā izpildes reizē jāiekļauj paralēlas negatīvās un pozitīvās kontroles, lai pierādītu, ka audu dzīvotspēja (kas noteikta ar negatīvo kontroli) un jutība (kas noteikta ar pozitīvo kontroli) atbilst pēc vēsturiskajiem datiem noteiktajiem pieņemamības diapazoniem. Paralēlā negatīvā kontrole arī nodrošina pamatdatus (100 % audu dzīvotspēja), lai aprēķinātu ar testējamo ķimikāliju apstrādāto audu relatīvo dzīvotspēju procentos ($\%Viability_{test}$). Ar *VRM* lietojamā ieteicamā pozitīvās kontroles viela ir neatšķaidīts metilacetāts (*CAS* Nr. 79-20-9, komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich*, kat. Nr. 45997; šķidrums). Ar *VRM1* un *VRM2* lietojamās ieteicamās negatīvās kontroles vielas ir attiecīgi ultratīrs H_2O un Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS. Šīs ir *VRM* validēšanas pētījumos izmantotās kontroles vielas, un par tām ir visvairāk vēsturisko datu. Piemērotu alternatīvu pozitīvās vai negatīvās kontroles vielu izmantošana zinātniski un pienācīgi jāpamato. Negatīvās un pozitīvās kontroles jātestē pēc tiem pašiem protokoliem, ko izmanto izpildes reizē iekļautajām testējamajām ķimikālijām (t. i., šķidrumiem un/vai cietām vielām). Nākamā darbība pēc aplicēšanas un pirms MTT ķīmiskās analīzes attiecīgā gadījumā ir apstrādājamā parauga ekspozīcija, skalošana, pēcekspozīcijas iegremdēšana un pēcekspozīcijas inkubēšana, kā paredzēts kontrolēm, kuras izpilda paralēli šķidrām testējamajām ķimikālijām (sk. 32. punktu), vai kontrolēm, kuras izpilda paralēli cietām testējamajām ķimikālijām (sk. 33. punktu) (sk. 35. punktu) (34)(35). Ar vienu negatīvās un pozitīvās kontroles komplektu pietiek visām vienāda agregātstāvokļa (šķidrumiem vai cietām vielām) testējamajām ķimikālijām vienā un tajā pašā izpildes reizē.

Audu dzīvotspējas mērījumi

35. Audu dzīvotspējas mērīšanai ar šo testēšanas metodi izmantojamā standartizētā kvantitatīvā metode (16) ir MTT ķīmiskā analīze. Tā ir audu trīsdimensiju konstrukcijai piemērota metode. MTT ķīmisko analīzi veic tūlīt pēc pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda. Saskaņā ar *VRM RhCE* audu konstrukcijas paraugu uz 180 ± 15 minūtēm ievieto 0,3 ml MTT šķīduma koncentrācijā 1 mg/ml standarta kultivēšanas apstākļos. *RhCE* audu konstrukcijas dzīvotspējīgās šūnas vitālo krāsvielu MTT reducē par zilas krāsas MTT formazāna nogulsnēm. Pēc tam izgulsnēto zilās krāsas MTT formazāna produktu no audiem ekstrahē, piemērotā tilpumā izmantojot izopropanolu (vai līdzīgu šķīdinātāju) (34)(35). Ar šķidrām testējamajām ķimikālijām testētie audi jāekstrahē gan no audu augšpuses, gan apakšpuses, bet ar cietām testējamajām ķimikālijām un krāsainiem šķidrumiem testētos audus pietiek ekstrahēt no audu apakšpuses (lai mazinātu izopropanola ekstrakcijas šķīduma iespējamo kontaminēšanu ar testējamo ķimikāliju, kas varētu būt palikusi uz audiem). Arī ar šķidrām testējamajām ķīmiskajām vielām, kas nav viegli noskalojamas, testētos audus pietiek ekstrahēt tikai no audu apakšpuses. Paralēli testētās negatīvās un pozitīvās kontroles vielas jāapstrādā līdzīgi testējamajai ķimikālijai. Ekstrahēto MTT formazānu var kvantitatīvi noteikt ar standarta absorbcijas (OB) mērījumu pie viļņa garuma 570 nm, izmantojot frekvenču joslas filtru, kas nepārsniedz ± 30 nm, vai ar *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 42. punktu) (11)(36).

▼**M8**

36. Testējamās ķimikālijas optiskās īpašības vai ķīmiskās reakcijas ar MTT var traucēt MTT formazāna noteikšanu, un tāpēc dzīvotspēja var būt noteikta nepareizi. Testējamās ķimikālijas var ietekmēt MTT formazāna noteikšanu, MTT tieši reducējot par zilas krāsas MTT formazānu un/vai krāsas interferences dēļ, ja testējamā ķimikālija dabiski vai apstrādes procedūru rezultātā absorbējas tādā pašā OB diapazonā kā MTT formazāns (t. i., apmēram 570 nm). Pirms testēšanas jāveic priekšpārbaudes, lai varētu identificēt potenciālus tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas, un šādu testējamo ķimikāliju radītās iespējamās interferences noteikšanai un korekcijām jāizmanto papildu kontroles (sk. 37.–41. punktu). Īpaši svarīgi tas ir tad, ja kādu konkrētu testējamo ķimikāliju pilnībā nenoskalo no *RhCE* audu konstrukcijas vai ja tā iespiežas radzenei līdzīgajā epitēlijā un tāpēc MTT ķīmiskās analīzes laikā atrodas *RhCE* audu konstrukcijās. Testējamām ķimikālijām, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes) un kurām pārāk lielas interferences, t. i., lielas absorbcijas pie viļņa garuma 570 ± 30 nm, dēļ nav izmantojams MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērījums, MTT formazāna noteikšanai var izmantot *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūru (sk. 41. un 42. punktu) (11)(36). *VRM* standartprocedūrās ir pieejams plašs apraksts par to, kā noteikt un koriģēt tiešo MTT redukciju un krāsvielu interferenci (34)(35). III un IV papildinājumā sniegtas arī ilustratīvas diagrammas ar norādījumiem par to, kā identificēt tiešos MTT reducētājus un/vai krāsu interferējošas ķimikālijas un kā ar tām rīkoties attiecīgi *VRM1* un *VRM2* gadījumā.

37. Lai noteiktu iespējamo interferenci, ko rada testējamās ķimikālijas, kas absorbē gaismu tādā pašā diapazonā kā MTT formazāns (dabiski vai pēc apstrādes), un lemtu par papildu kontroļu nepieciešamību, testējamo ķimikāliju pievieno ūdenim un/vai izopropanolam un attiecīgo laiku inkubē istabas temperatūrā (sk. 2. papildinājumu, (34)(35)). Ja ar *VRM1* testējamā ķimikālija ūdenī un/vai izopropanolā absorbē pietiekamu gaismu diapazonā 570 ± 20 nm (sk. 3. papildinājumu) vai ja ar *VRM2*, sajaucot testējamo ķimikāliju ar ūdeni, iegūst krāsainu šķīdumu (sk. 4. papildinājumu), pieņem, ka testējamā ķimikālija interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, un tad jāizpilda papildu kontroles ar krāsvielu vai arī jāizmanto *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūra; minētās kontroles šādā gadījumā nav vajadzīgas (sk. 41. un 42. punktu un III un IV papildinājumu) (34)(35). Mērot standartabsorbciju (OB), katru interferējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem dzīvotspējīgu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču, lai iegūtu NSC_{living} kontroli (nespecifiska krāsa dzīvos audos), MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā (34)(35). Ņemot vērā dzīvajiem audiem raksturīgo bioloģisko mainību, NSC_{living} kontrole jāveic paralēli iekrāsotās ķimikālijas testēšanai un vairākkārtējas testēšanas gadījumā katram veiktajam testam (katrā izpildes reizē) jāveic neatkarīga NSC_{living} kontrole. Faktisko audu dzīvotspēju tad aprēķina, no audu dzīvotspējas procentiem, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un MTT šķīdumā inkubētiem dzīviem audiem ($\%Viability_{test}$), atņemot nespecifiskas krāsas procentus, kas iegūti ar interferējošajai testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, kuri paralēli koriģējamajam testam inkubēti barotnē bez MTT ($\%NSC_{living}$). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. Lai identificētu tiešos MTT reducētājus, katra testējamā ķimikālija jāpievieno svaigi pagatavotam MTT šķīdumam. MTT šķīdumam pievieno attiecīgu daudzumu testējamās ķimikālijas un maisījumu apmēram 3 stundas inkubē standarta kultivēšanas apstākļos (skatīt III un IV papildinājumu) (34)(35). Ja

▼**M8**

MTT maisījums, kas satur testējamo ķimikāliju (nešķīstošas testējamās ķimikālijas gadījumā, tās suspensiju), kļūst zils/violets, pieņem, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, un neatkarīgi no standarta absorbcijas (OB) mērījuma vai *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas procedūras izmantošanas dzīvotnespējīgu *RhCE* audu konstrukcijām jāveic papildu funkcionāla pārbaude. Šajā papildu funkcionālajā pārbaudē izmanto nonāvētus audus, kuriem piemīt vairs tikai atlikusī metaboliskā aktivitāte, taču kuri testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā tāpat kā dzīvotspējīgie audi. *VRM1* nonāvētos audus sagatavo, tos eksponējot zemai temperatūrai ("nonāvēti aukstumapstrādāti"). *VRM2* nedzīvos audus sagatavo, tos ilgstoši (piem., vismaz 24 stundas ± 1 stundu) inkubējot ūdenī un pēc tam glabājot zemā temperatūrā ("nonāvēti ūdensapstrādāti"). Katru MTT reducējošo testējamo ķimikāliju aplicē uz vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, lai iegūtu nespecifisku MTT redukcijas (*NSMTT*) kontroli (34)(35). Ar vienu *NSMTT* kontroli pietiek vienai testējamai ķimikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar MTT reducētājam eksponētiem dzīviem audiem (%$Viability_{test}$), atņemot procentuālo nespecifisko MTT redukciju, kas iegūta ar tam pašam MTT reducētājam eksponētiem nonāvētiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (%*NSMTT*). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [%$Viability_{test}$] - [%*NSMTT*].

39. Testējamām ķimikālijām, kas identificētas kā krāsu interferējošas (sk. 37. punktu) un tiešu MTT redukciju izraisošas (sk. 38. punktu), standarta absorbcijas (OB) mērījumu veikšanai papildus iepriekšējos punktos aprakstītajām *NSMTT* un NSC_{living} kontrolēm būs nepieciešams arī trešais kontroļu komplekts. Parasti tā ir tumšas krāsas testējamajām ķimikālijām, kas gaismu absorbē 570 ± 30 nm diapazonā (piemēram, zilām, violetām, melnām), jo to sākotnējā krāsa traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. Tāpēc pēc noklusējama jālieto *NSMTT* kontroles kopā ar NSC_{living} kontrolēm. Testējamās ķimikālijas, kuras tiek pārbaudītas ar abām – *NSMTT* un NSC_{living} – kontrolēm, var absorbēt un saglabāt gan dzīvie, gan nonāvētie audi. Tāpēc šajā gadījumā *NSMTT* kontrole var koriģēt ne tikai testējamās ķimikālijas izraisīto iespējamo tiešo MTT redukciju, bet arī krāsas interferenci, kas rodas no tā, ka testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā nonāvētie audi. Šādi kļūst iespējama dubulta krāsas interferences koriģēšana, jo NSC_{living} kontrole jau koriģē krāsas interferenci, kas rodas no tā, ka testējamo ķimikāliju absorbē un saglabā dzīvie audi. Lai novērstu iespējamo dubulto krāsas interferences koriģēšanu, jāveic trešā kontrole attiecībā uz nespecifisku krāsu nedzīvos audos (NSC_{killed}) (sk. III un IV papildinājumu) (34)(35). Pārbaudē ar šo papildu kontroli testējamo ķimikāliju izmanto vismaz diviem nonāvētu audu replikātiem, ar kuriem veic visu testēšanas procedūru, taču MTT inkubācijas posmā tos inkubē barotnē, nevis MTT šķīdumā. Ar vienu NSC_{killed} kontroli pietiek vienai testējamai ķimikālijai neatkarīgi no veikto neatkarīgo testu / izpildes reižu skaita, taču tā jāizdara paralēli *NSMTT* kontrolei un ar to pašu audu partiju. Audu faktisko dzīvotspēju tad aprēķina, no procentuālās audu dzīvotspējas, kas iegūta ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem (%$Viability_{test}$), atņemot % *NSMTT* un atņemot %NSC_{living}, un pieskaitot procentuālo nespecifisko krāsu, kas iegūta ar interferējošai testējamajai ķimikālijai eksponētiem un barotnē bez MTT inkubētiem nonāvētajiem audiem un aprēķināta attiecībā pret negatīvo kontroli, kura izpildīta paralēli koriģējamam testam (%NSC_{killed}). Tātad faktiskā audu dzīvotspēja = [%$Viability_{test}$] - [%*NSMTT*] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

▼**M8**

40. Svarīgi ievērot, ka (tad, kad veic standarta absorbcijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija un nespecifiskā krāsas interference var palielināt audu ekstrakta OB virs spektrofotometra linearitātes diapazona un ka (tad, kad veic *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas mērījumus) nespecifiskā MTT redukcija var palielināt arī audu ekstrakta MTT formazāna smailes laukumu virs spektrofotometra linearitātes diapazona. Pamatojoties uz to, ir svarīgi, lai pirms normatīviem mērķiem veiktas ķimikāliju testēšanas sākuma katra laboratorija noteiktu sava spektrofotometra OB/smailes laukuma linearitātes diapazonu, piem., ar MTT formazānu (*CAS* Nr. 57360-69-7), kas komerciāli pieejams, piem., no *Sigma-Aldrich* (kat. Nr. M2003).

41. Standarta absorbcijas (OB) noteikšana ar spektrofotometru ir piemērota tiešu MTT reducētāju un krāsu interferējošu testējamo ķimikāliju novērtēšanai, ja novērotā interference MTT formazāna noteikšanā nav pārāk spēcīga (t. i., ar testējamo ķimikāliju iegūtie audu ekstraktu OB, nekoriģējot tiešu MTT redukciju un/vai krāsas interferenci, atbilst spektrofotometra lineārajam diapazonam). Tomēr par testējamajām ķimikālijām iegūtie rezultāti, kuriem negatīvās kontroles %*NSMTT* un/vai %NSC_{living} ir ≥ 60 % (*VRM1* un *VRM2* šķidrumu protokolam) vai 50 % (*VRM2* cietu vielu protokolam), būtu jāuztver piesardzīgi, jo tā ir robežvērtība, ko *VRM* izmanto, lai nošķirtu klasificējamas ķimikālijas no neklasificējamām ķimikālijām (sk. 44. punktu). Standarta absorbciju (OB) tomēr nevar noteikt, ja interference MTT formazāna noteikšanā ir pārāk liela (t. i., izraisa to, ka nekoriģētie testējamo audu ekstraktu OB ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona). Ja krāsainas testējamās ķimikālijas vai testējamās ķimikālijas, kam krāsa izveidojas saskarē ar ūdeni vai izopropanolu, pārāk stipri interferē ar MTT formazāna standarta absorbcijas (OB) mērīšanu, tās tomēr var novērtēt ar *HPLC/UPLC* spektrofotometriju (sk. III un IV papildinājumu). Tas ir tāpēc, ka ar *HPLC/UPLC* sistēmu MTT formazānu no ķimikālijas var atdalīt pirms kvantitatīvās noteikšanas (36). Tāpēc neatkarīgi no testējamās ķimikālijas, ja tiek izmantota *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrija, NSC_{living} vai NSC_{killed} kontroles nav jāveic. Ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija tieši reducē MTT, *NSMTT* kontroles tomēr jāizmanto (atbilstoši 38. punktā aprakstītajai procedūrai). *NSMTT* kontroles jāizmanto arī testējamām ķimikālijām, kurām ir krāsa (jau sākotnēji vai parādās, kad viela ir ūdenī), kas traucē novērtēt to spēju tieši reducēt MTT, kā aprakstīts 38. punktā. MTT formazāna mērīšanai izmantojot *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju, kā MTT formazāna smailes laukuma, kas iegūts ar testējamajai ķimikālijai eksponētiem dzīviem audiem, procentuālo attiecību pret MTT formazāna smailes laukumu, kas iegūts ar paralēlo negatīvo kontroli, aprēķina audu procentuālo dzīvotspēju. Testējamām ķimikālijām, kas spēj tieši reducēt MTT, audu faktisko dzīvotspēju aprēķina, no % $Viability_{test}$ atņemot %*NSMTT*, kā aprakstīts 38. punkta pēdējā teikumā. Visbeidzot jāņem vērā, ka tādus tiešus MTT reducētājus vai tiešus MTT reducētājus, kas turklāt ir krāsu interferējoši, kuri pēc apstrādes saglabājas audos un reducē MTT tik spēcīgi, ka testējamo audu ekstraktu OB (noteikti ar standarta OB mērījumu) vai smaiļu laukumi (noteikti ar *UPLC/HPLC* spektrofotometriju) ir ārpus spektrofotometra lineārā diapazona, nav iespējams novērtēt ar *RhCE* testēšanas metodēm, lai gan tas sagaidāms tikai ļoti retās situācijās.

42. *HPLC*/*UPLC* spektrofotometriju MTT formazāna mērīšanai var izmantot ar visa veida testējamajām ķimikālijām (ar krāsu, bez krāsas, MTT reducētāji un MTT nereducētāji) (11) (36). *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas ir dažādas, tāpēc katram lietotājam nav praktiski iespējams noteikt pilnīgi vienādus sistēmas darbības apstākļus. Tāpēc, pirms *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu izmantot, lai kvantificētu no audu ekstraktiem iegūtu MTT

▼M8

formazānu, būtu jāpierāda minētās sistēmas kvalifikācijas atbilstība pieņemamības kritērijiem, kas noteikti kvalifikācijas standartparametru kopumam, kuru pamatā ir parametri, kas aprakstīti ASV Pārtikas un zāļu pārvaldes izstrādātājās nozares vadlīnijās par bioanalītisko metožu validēšanu (36)(38). Šie galvenie parametri un to pieņemamības kritēriji ir norādīti 5. papildinājumā. Kad 5. papildinājumā noteiktie pieņemamības kritēriji izpildīti, *HPLC*/*UPLC* spektrofotometrijas sistēmu uzskata par kvalificētu un gatavu tam, lai noteiktu MTT formazāna daudzumu, ievērojot šīs testēšanas metodes aprakstā sniegtos eksperimentēšanas nosacījumus.

Pieņemamības kritēriji

43. Katrā testēšanas reizē, kad izmanto *RhCE* audu partijas, kas atbilst kvalitātes kontroles prasībām (sk. 30. punktu), ar negatīvās kontroles vielu apstrādāto audu OB jābūt tādam, kas atspoguļo to audu kvalitāti, kuriem ievērotas prasības sūtīšanas, saņemšanas posmiem un visiem protokola procesiem, un to rezultāti nedrīkst būt ārpus 2. tabulā aprakstītajām vēsturiski noteiktajām robežām (sk. 26. punktu). Tāpat ar pozitīvās kontroles vielu, t. i., metilacetātu, apstrādāto audu vidējai dzīvotspējai jābūt < 50 % attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM1* šķidrumu vai cietu vielu protokoliem un ≤ 30 % (šķidrumu protokolam) vai ≤ 20 % (cietu vielu protokolam) attiecībā pret negatīvo kontroli *VRM2*, tādējādi atspoguļojot audu spēju reaģēt uz kairinošu testējamo ķimikāliju šīs testēšanas metodes apstākļos (34)(35). Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu audu replikātu mainībai jāatbilst pieņemtajām robežām (t. i., dzīvotspējas atšķirībai starp diviem audu replikātiem jābūt mazākai par 20 % vai arī standartnovirze (SD) starp trim audu replikātiem nedrīkst pārsniegt 18 %). Ja izpildes reizē iekļautā negatīvā kontrole vai pozitīvā kontrole neatbilst pieņemtajiem diapazoniem, izpildes reizi uzskata par "nekvalificētu", un tā jāatkārto. Ja testējamās ķimikālijas audu replikātu mainība neatbilst pieņemtajam diapazonam, tests jāuzskata par "nekvalificētu", un testējamā ķimikālija jātestē atkārtoti.

Rezultātu interpretēšana un prognostiskais modelis

44. Katras testējamās ķimikālijas audu replikātu ekstraktiem iegūtās OB vērtības / smailes laukumi jāizmanto vidējās audu dzīvotspējas procentos (vidējā vērtība starp audu replikātiem) aprēķināšanai salīdzinājumā ar negatīvo kontroli, kas noteikta kā 100 %. Audu procentuālās dzīvotspējas robežvērtības, pēc kurām nosaka, kuras testējamās ķimikālijas nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus (ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas), norādītas 4. tabulā. Tādējādi rezultāti jāinterpretē, kā aprakstīts tālāk tekstā.

— Testējamo ķimikāliju nosaka par tādu, kas nav jāklasificē un jāmarķē saskaņā ar ANO GHS / *CLP* (nekategorizētas ķimikālijas), ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir lielāka par (>) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, kas norādīta 4. tabulā. Šādā gadījumā nav nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm.

▼M8

— Ja audu vidējā procentuālā dzīvotspēja pēc ekspozīcijas un pēcekspozīcijas inkubēšanas perioda ir mazāka par vai vienāda ar (≤) audu procentuālajai dzīvotspējai noteikto robežvērtību, prognozēšana nav iespējama (norādīts 4. tabulā). Šādā gadījumā būs nepieciešama papildu testēšana ar citām testēšanas metodēm, jo *RhCE* testēšanas metodes uzrāda zināmu skaitu pseidopozitīvu rezultātu (sk. 14.–15. punktu), un nav iespējams izšķirties starp ANO GHS un *CLP* 1. un 2. kategoriju (sk. 17. punktu).

4. tabula

Prognostiskie modeļi sakaņā ar ANO GHS / *CLP* klasifikāciju

VRM	Nekategorizēta	Nav iespējams prognozēt
VRM1 — EpiOcular™ *EIT* (abiem protokoliem)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
VRM2 — SkinEthic™ *HCE EIT* (šķidrumu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 60 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 60 %
VRM2 — SkinEthic™ *HCE EIT* (cietvielu protokolam)	Audu vidējā dzīvotspēja > 50 %	Audu vidējā dzīvotspēja ≤ 50 %

45. Vienam testam ar vismaz diviem audu replikātiem jābūt pietiekamam gadījumos, kad testējamās ķimikālijas uzrādītais rezultāts ir nepārprotams. Tomēr, kad rezultāti ir neskaidri, piem., nesakritīgi mērījumu rezultāti atkārtojumos un/vai vidējā audu dzīvotspēja procentos ir 60 ± 5 % (*VRM1*, kā arī *VRM2* šķidrumu protokolam) vai 50 ± 5 % (*VRM2* cietvielu protokolam), jāapsver vajadzība pēc otrā vai pat pēc trešā testa, ja nesakrīt pirmo divu testu rezultāti.

46. Īpašu veidu maisījumiem, ja tas ir piemēroti un pamatoti, var apsvērt atšķirīgas audu dzīvotspējas procentos robežvērtības, pēc kā klasificējamas ķimikālijas nošķir no neklasificējamām ķimikālijām, lai palielinātu testēšanas metodes vispārējo veiktspēju šādu veidu maisījumiem (sk. 14. punktu). Etalonķimikālijas var noderēt, lai novērtētu nezināmu testējamo ķimikāliju vai produktu klases spēju izraisīt nopietnus acu bojājumus / acu kairinājumu vai novērtētu klasificētas ķimikālijas relatīvo spēju izraisīt acu toksicitāti konkrētā pozitīvu atbildreakciju diapazonā.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Dati

47. Datus par atsevišķiem audu replikātiem katrā izpildes reizē, arī par atkārtotiem testiem, ja tos veic, (piem., OB vērtības / MTT formazāna smailes laukumus un aprēķinātās audu procentuālās dzīvotspējas datus par testējamo ķimikāliju un kontrolēm, kā arī galīgo *RhCE* testēšanas metodes prognozi) tabulas veidā apkopo par katru testējamo ķimikāliju. Pārskatā jāiekļauj arī vidējā audu dzīvotspēja procentos un dzīvotspējas atšķirība starp diviem audu replikātiem (ja n = 2 audu replikāti) vai SN (ja n ≥ 3 audu replikāti) par katru atsevišķu testējamo ķimikāliju un kontroli. Pārskatā jāiekļauj visas katrai testējamai ķimikālijai novērotās interferences MTT formazāna mērīšanā, kuras izpaužas kā tieša MTT redukcija un/vai krāsas interference.

Testēšanas pārskats

48. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju.

▼**M8**

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta viela

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.

— Agregātstāvoklis, gaistamība, pH, LogP, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā un ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Apstrāde pirms testēšanas, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

— Agregātstāvoklis un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

Pozitīvās un negatīvās kontroles vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati.

— Agregātstāvoklis, gaistamība, molekulmasa, ķīmisko vielu klase un papildu attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības saistībā ar pētījuma veikšanu, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana).

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama.

— Pamatojums citas tādas negatīvās kontroles izmantošanai, kas nav ultratīrs H_2O vai Ca_{2+}/Mg_{2+} nesaturošs DPBS, ja tāda izmantota.

— Pamatojums citas tādas pozitīvās kontroles izmantošanai, kas nav neatšķaidīts metilacetāts, ja tāda izmantota.

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo un negatīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem.

Informācija par sponsoru un testējošo iestādi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese.

— RhCE *audu konstrukcija un izmantotais protokols (attiecīgā gadījumā ar izvēles pamatojumu)*

▼**M8**

Testēšanas metodes apstākļi

— Izmantotā *RhCE* audu konstrukcija, arī partijas numurs.

— MTT formazāna noteikšanai izmantotais viļņa garums un frekvenču josla (attiecīgā gadījumā), kā arī mērierīces (piem., spektrofotometra) linearitātes diapazons.

— MTT formazāna noteikšanai izmantotās metodes apraksts.

— Izmantotās *HPLC/UPLC* spektrofotometrijas sistēmas apraksts (attiecīgā gadījumā).

— Pilnīga papildinformācija par konkrēto izmantoto *RhCE* audu konstrukciju, arī tās veiktspējas raksturlielumi. No tiem jānorāda vismaz:

i) dzīvotspējas kvalitātes kontrole (piegādātājs);

ii) dzīvotspēja testēšanas metodes apstākļos (lietotājs);

iii) barjerfunkcijas kvalitātes kontrole;

iv) morfoloģija, ja ir pieejama informācija;

v) reproducējamība un prognozētspēja;

vi) *RhCE* audu konstrukcijas citas kvalitātes kontroles (*QC*), ja ir pieejama informācija.

— Norāde uz *RhCE* audu konstrukcijas vēsturiskajiem datiem. No tiem jānorāda vismaz: *QC* datu pieņemamība saskaņā ar vēsturiskajiem datiem par partiju kontroles rezultātiem.

— Paziņojums, ka pirms regulāras izmantošanas testējošā iestāde ir pierādījusi kompetenci testēšanas metodes izmantošanā, testējot standartķimikālijas.

Izpildes reizes un testa pieņemamības kritēriji

— Pozitīvās un negatīvās kontroles vidējās vērtības un pieņemamības diapazoni, kas balstīti uz vēsturiskajiem datiem.

— Pieņemamā mainība pozitīvām un negatīvām kontrolēm izmantojamiem audu replikātiem.

— Pieņemamā mainība testējamai ķimikālijai izmantojamiem audu replikātiem.

Testa procedūra

— Informācija par izmantoto testēšanas procedūru.

— Izmantotās testējamās ķimikālijas un kontroles vielu devas.

— Ekspozīcijas, pēcekspozīcijas iegremdēšanas un pēcekspozīcijas inkubēšanas periodu ilgums un temperatūra (attiecīgā gadījumā).

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas.

▼M8

— Kontroles, kas izmantotas tiešajiem MTT reducētājiem un/vai testējamajām ķimikālijām, kurām ir krāsa (attiecīgā gadījumā).

— Katrai testējamai ķimikālijai un kontrolēm (pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, *NSMTT*, NSC_{living} un NSC_{killed}, ja tādas izmantotas) izmantoto audu replikātu skaits.

Rezultāti

— Datu apkopojums tabulā par atsevišķām testējamajām ķimikālijām un kontroles vielām par katru izpildes reizi (arī par atkārtotiem eksperimentiem, ja tādi veikti) un par katru replikāta mērījumu, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, audu dzīvotspēja procentos, vidējā audu dzīvotspēja procentos, atšķirība starp audu replikātiem vai SN un galīgā prognoze.

— Attiecīgā gadījumā tiešiem MTT reducētājiem un/vai krāsainām testējamajām ķimikālijām izmantoto kontroļu rezultāti, arī OB vērtība vai MTT formazāna smailes laukums, %*NSMTT*, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, atšķirība starp audu replikātiem vai SN, galīgā pareizā audu dzīvotspēja procentos un galīgā prognoze.

— Rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķimikāliju (ķimikālijām) un kontrolķimikālijām, salīdzinājumā ar noteiktajiem izpildes reizes un testa pieņemamības kritērijiem.

— Citas novērotās ietekmes, piem., krāsainas testējamās ķimikālijas izraisītas audu iekrāsošanās, apraksts.

Rezultātu iztirzājums

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) UN (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Šā pielikuma B.5. nodaļa "Akūts acu kairinājums/korozija".

(3) Šā pielikuma B.47. nodaļa "Liellopu radzenes apduļķošanās un caurlaidības testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā tādas, kas izraisa acu kairinājumu vai nopietnus acu bojājumus".

(4) Šā pielikuma B.48. nodaļa "Izolētas vistas acs testēšanas metode, kurā identificē i) nopietnu acu bojājumu inducētājas ķimikālijas un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē".

(5) Šā pielikuma B.61. nodaļa "Fluoresceīna caurplūdes testēšanas metode acu korozijas vai nopietna kairinājuma izraisītāju identificēšanai".

▼**M8**

(6) Šā pielikuma B.68. nodaļa "Īsa ekspozīcijas laika *in vitro* testēšanas metode, ar kuru identificēt i) ķimikālijas, kas izraisa nopietnus acu bojājumus, un ii) ķimikālijas, kuras nav jāklasificē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītājas".

(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* 27, Special Issue 2010,261-266.

(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 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (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. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at: 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* 31, 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* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Available at: 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. (Manuscript in Preparation).

(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* 82, 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* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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.* 39, 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. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 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* 27, 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* 27, 1476-1488.

(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.* 43, 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.* 88, 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.* 91, 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* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(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.* 39, 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.* 36, 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* 15, 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.* 39, 2610–2625.

(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.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: 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* 29, 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.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: 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, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā ar testēšanas metodi iegūto mērījumu rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testēšanas metodes veiktspējas mērs un viens no relevantuma aspektiem. Šo terminu bieži izmanto ar nozīmi "konkordantums", ar to domājot testēšanas metodes pareizo rezultātu īpatsvaru (18).

Etalonķimikālija: ķimikālija, ko izmanto par standartu salīdzināšanā ar testējamo ķimikāliju. Etalonķimikālijai jāpiemīt šādām īpašībām: i) konsekvents un uzticams avots vai avoti tās identificēšanas un raksturošanas vajadzībām; ii) strukturāla, funkcionāla un/vai ķīmiska un produktklases līdzība ar testējamo ķimikāliju; iii) labi zināmas fizikālķīmiskās īpašības; iv) papildu dati par zināmajiem iedarbības veidiem; v) vielas zināmais iedarbības stiprums atbilst vēlamās atbildreakcijas diapazonam.

Augšupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto testējamai ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā nav jāklasificē vai jāmarķē kā acu kairinājuma vai nopietnu acu bojājumu izraisītāja, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras nav jāklasificē vai jāmarķē (negatīvs iznākums), no citām ķimikālijām (pozitīvs iznākums).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

Konkordantums: sk. "Pareizības" definīciju.

Radzene: acābola priekšējā caurspīdīgā daļa, kas pārklāj varavīksneni un zīlīti un ielaiž acī gaismu.

VK: variācijas koeficients.

Nov.: novirze.

EIT: acu kairinājuma tests.

EURL-ECVAM: Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā.

Acu kairinājums: izmaiņas acī, kas rodas pēc testējamās ķimikālijas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas ir pilnīgi atgriezeniskas. Nozīmē to pašu, ko "atgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 2. kategorija.

ET_{50}: ekspozīcijas laiks, kas pēc noteiktas koncentrācijas etalonķimikālijas aplicēšanas nepieciešams audu dzīvotspējas samazināšanai par 50 %.

Pseidonegatīvu īpatsvars: visu to vielu daļa, kurām ir attiecīgā veida iedarbība, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām bez attiecīgā veida iedarbības. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Pseidopozitīvu īpatsvars: visu to vielu daļa, kurām nav attiecīgā veida iedarbības, bet kuras ar konkrēto testēšanas metodi tiek kļūdaini identificētas par vielām ar attiecīgā veida iedarbību. Tas ir viens no testēšanas metodes veiktspējas raksturlielumiem.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (sub)populāciju.

HCE: SkinEthic™ cilvēka radzenes epitēlijs.

▼M8

HPLC: augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

IC_{50}: koncentrācija, kādā etalonķimikālija pēc noteikta ekspozīcijas laika (piem., 30 minūšu apstrādes ar SDS) audu dzīvotspēju samazina par 50 %.

Pārmērīga deva: uz *RhCE* audu konstrukcijas aplicētās testējamās ķimikālijas daudzums, kas ir lielāks par epitēlija virsmas pilnīgai un vienmērīgai pārklāšanai nepieciešamo daudzumu.

Neatgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

LLOQ: kvantitatīvās noteikšanas apakšējā robeža.

LogP: oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta logaritms.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu viela tiek iegūta ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu viela rodas ķīmiskā reakcijā.

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds; tiazolilzilais tetrazolija bromīds.

Negatīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā neinducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, un to izmanto, lai noteiktu 100 % audu dzīvotspēju.

Neklasificētas ķimikālijas: ķimikālijas, kuras nav klasificētas kā acu kairinājuma (ANO GHS / *CLP* 2. kategorija, ANO GHS 2A vai 2B kategorija) vai nopietnu acu bojājumu (ANO GHS / *CLP* 1. kategorija) izraisītājas. Nozīmē to pašu, ko "ANO GHS / *CLP* nekategorizētas ķimikālijas".

NSC_{killed}: nespecifiska krāsa nedzīvos audos.

NSC_{living}: nespecifiska krāsa dzīvos audos.

NSMTT: nespecifiskā MTT redukcija.

OB: optiskais blīvums.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi (tādu, kura tiek uzskatīta par zinātniski validētu) bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē pēc noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testēšanas metožu salīdzināmību. Šeit iekļauti: (i) nepieciešamie testēšanas metodes komponenti; (ii) minimāls tādu references ķimikāliju saraksts, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; iii) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmi pareizības un ticamības līmeņi, kā būtu jāiegūst ar ierosināto testēšanas metodi, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (18).

▼M8

Pozitīvā kontrole: paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka konkrētajā testa sistēmā tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Ar šo paraugu izdara tādas pašas manipulācijas kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem. Lai būtu iespēja novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testēšanas metodes pareizības (konkordantuma) aspektu (18).

Ticamība: pakāpe, kādā vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc viena un tā paša protokola var ilgāku laiku reproducējami izmantot konkrētu testēšanas metodi. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (18).

Aizstājējtests: ikdienā lietota testa aizstāšanai paredzēts tests, kuru pieņemts izmantot bīstamības identificēšanai un/vai riska novērtēšanai, ar pierādītu spēju ekvivalentā vai labākā veidā, salīdzinot ar pieņemto testu, nodrošināt (pēc vajadzības) cilvēka un dzīvnieku veselības vai vides aizsardzību visās iespējamās testēšanas situācijās un ar visām iespējamām ķimikālijām (18).

Reproducējamība: tādu rezultātu savstarpējā atbilstība, kas iegūti, ar vienu un to pašu testa protokolu testējot vienu to pašu ķimikāliju (sk. "Ticamības" definīciju) (18).

Atgriezeniska ietekme uz acīm: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

RhCE: rekonstruēts cilvēka radzenei līdzīgs epitēlijs.

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli negatīvai kontrolei un pozitīvai kontrolei.

SD: standartnovirze.

Jutība: tā visu pozitīvo/aktīvo testējamo ķimikāliju daļa, kas ar testu tiek pareizi klasificētas. Tas ir pareizības mērs testēšanas metodei, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

▼**M8**

Nopietni acu bojājumi: acs audu bojājumi vai nopietna fiziska redzes paslikti-nāšanās, kas rodas pēc testējamās vielas aplicēšanas uz acs priekšējās virsmas un kas 21 dienas laikā pēc aplicēšanas nav pilnībā atgriezeniska. Nozīmē to pašu, ko "neatgriezeniska ietekme uz acīm" un ANO GHS / *CLP* 1. kategorija.

Darbības standartprocedūras (*SOP*): oficiālas, rakstiskas procedūras, kas detalizēti apraksta, kā veicamas konkrētas rutīnas un konkrētam testam specifiskas laboratorijas darbības. Tās ir nepieciešamas saskaņā ar labu laboratorijas praksi (*GLP*).

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām testējamajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tādas testēšanas metodes pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testēšanas metodes relevantuma izvērtēšanā (18).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai nepieciešamās piedevas, kā arī izmanto-tajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Tests: atsevišķas testējamās ķimikālijas paralēla testēšana ar vismaz diviem audu replikātiem, kā noteikts attiecīgajā *SOP*.

Audu dzīvotspēja: parametrs, ar ko šūnu populācijas kopējo aktivitāti rekon-struētos audos mēra kā to spēju reducēt vitālo krāsvielu MTT, kas atkarībā no nosakāmā beigupunkta un izmantotās testēšanas shēmas korelē ar dzīvo šūnu kopskaitu un/vai dzīvotspēju.

Lejupēja pieeja: pakāpeniska pieeja, ko izmanto ķimikālijai, par kuru ir aizdomas, ka tā izraisa nopietnus acu bojājumus, un kas sākas ar to ķimikāliju nošķiršanu, kuras inducē nopietnus acu bojājumus (pozitīvs rezultāts), no citām ķimikālijām (negatīvs rezultāts).

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Secīgas testēšanas stratēģija: pakāpeniskas testēšanas stratēģija, kurā testēšanas metodes pielieto noteiktā secībā. Izmantojot pierādījumu izsvēršanu, visu esošo informāciju par testējamo ķimikāliju pārskata, lai pirms pārejas uz nākamo stra-tēģijas pakāpi noteiktu, vai pieejamās informācijas apjoms ir pietiekams, lai pieņemtu lēmumu par bīstamības klasifikāciju. Ja testējamās ķimikālijas bīsta-mības potenciālu/potenci var noteikt, pamatojoties uz konkrētajā pakāpē pieejamo informāciju, papildu testēšana nav jāveic (18).

ULOQ: kvantitatīvās noteikšanas augšējā robeža.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un izmanto tādus attiecīgus komunikācijas elementus kā piktogrammas, signālvārdi, bīstamības apzīmējumi, drošības prasību apzīmējumi un drošības datu lapas, lai sniegtu informāciju par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi un tādējādi aizsargātu cilvēkus (arī darba devējus un darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (1).

ANO GHS un *CLP* 1. kategorija: sk. "Nopietnu acu bojājumu" definīciju.

ANO GHS un *CLP* 2. kategorija: sk. "Acu kairinājuma" definīciju.

ANO GHS un *CLP* nekategorizētas ķimikālijas: Ķimikālijas, kas neatbilst prasībām klasificēšanai ANO GHS / *CLP* 1. vai 2. kategorijā (vai ANO GHS 2A vai 2B kategorijā). Nozīmē to pašu, ko "neklasificētas ķimikālijas".

UPLC: īpaši augstefektīva šķidrumhromatogrāfija.

▼**M8**

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: testēšanas metode, kas tiek uzskatīta par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un kas ir balstīta uz zinātniskiem principiem. Testēšanas metode nekad nav derīga absolūtā izteiksmē; tā vienmēr ir derīga tikai kādam konkrētam nolūkam (18).

Validēta testēšanas metode: testēšanas metode, kuras relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (18).

VRM: validēta references metode.

VRM1: EpiOcular™ *EIT* dēvē par 1. validēto references metodi.

VRM2: SkinEthic™ *HCE EIT* dēvē par 2. validēto references metodi.

Pierādījumu izsvēršana: process, kurā izsver dažādu informācijas elementu stiprās un vājās puses, cenšoties izdarīt un pamatot secinājumu par testējamās vielas bīstamības potenciālu.

▼M8

2. papildinājums

ĶIMIKĀLIJU, KURAS NAV JĀKLASIFICĒ UN JĀMARĶĒ KĀ TĀDAS, KAS IZRAISA ACU KAIRINĀJUMU VAI NOPIETNUS ACU BOJĀJUMUS, IDENTIFICĒŠANAI VALIDĒTO *RHCE* TESTU GALVENĀS SASTĀVDAĻAS

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Protokoli	Šķidrumi (pilināmi ar pipeti 37 ± 1 °C vai zemākā temperatūrā 15 min)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)	Šķidrumi un viskozas vielas (pilināmi ar pipeti)	Cietas vielas (nav pilināmas ar pipeti)
Modeļa virsma	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Audu replikātu skaits	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2	Vismaz 2
Priekšpārbaude attiecībā uz krāsas interferenci	50 µl + 1 ml H_2O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķimikālijas), vai 50 µl + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h RT (krāsainas testējamās ķimikālijas) → ja testējamās ķimikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5 % no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	50 mg + 1 ml H_2O 60 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM (bezkrāsainas testējamās ķimikālijas) un/vai 50 mg + 2 ml izopropanola, maisa 2–3 h pie RT (krāsainas un bezkrāsainas testējamās ķimikālijas) → ja testējamās ķimikālijas OB pie 570±20 nm pēc izopropanola vai ūdens OB atņemšanas ir > 0,08 (tas atbilst apmēram 5 % no negatīvās kontroles vidējā OB), jāpielieto dzīvas pielāgotas kontroles	10 mg + 90 µl H_2O maisa 30 ± 2 min pie istabas temperatūras (RT, 18-28°C) → ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem	10 mg + 90 µl H_2O maisa 30 ± 2 min pie RT → ja testējamā ķimikālija ir krāsaina, jāpielieto pielāgotas kontroles ar dzīviem audiem

▼M8

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Priekšpārbaude attiecībā uz tiešo MTT reducēšanos	50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem aukstumapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 50 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml šķīduma 180 ± 15 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO2, ≥ 95 % RM → ja šķīdums iekrāsojas zils vai violets, jāizdara pielāgotas kontroles ar nonāvētiem ūdensapstrādātiem audiem (par negatīvo kontroli izmanto 30 µl sterila dejonizēta ūdens MTT šķīdumā)
Priekšapstrāde	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS 30 ± 2 min 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM, sargājot no gaismas	—	—
Apstrādes devas un aplicēšana	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) ar kalibrētu instrumentu (piem., pilna karote bez kaudzes, kas kalibrēta 50 mg nātrija hlorīda ietveršanai).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) viskozām vielām izmanto neilona sietu	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošs DPBS + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Ekspozīcijas ilgums un temperatūra	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	6 stundas (± 0,25 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	30 min (± 2 min) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	4 stundas (± 0,1 h) kultūras barotnē: 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM
Skalošana istabas temperatūrā	3 reizes 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošā DPBS	3 reizes 100 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturošā DPBS	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS
Pēcekspozīcijas iegremdēšana	12 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	25 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) 37 °C temperatūrā, 5 % CO_2, 95 % RM, kultūras barotnē	30 min (± 2 min) pie RT, kultūras barotnē

▼M8

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Pēcekspozīcijas inkubēšana	120 min (± 15 min) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	18 h (± 0,25 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	nav	18 h (± 0,5 h) kultūras barotnē 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM
Negatīvā kontrole	50 µl H_2O Testē paralēli	50 µl H_2O Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS Testē paralēli	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+} nesaturoša DPBS Testē paralēli
Pozitīvā kontrole	50 µl metilacetāta Testē paralēli	50 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli	30 ± 2 µl metilacetāta Testē paralēli
MTT šķīdums	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT inkubācijas ilgums un temperatūra	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM	180 min (± 15 min) 37 ± 2 °C temperatūrā, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RM
Ekstrakcijas šķīdinātājs	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas, caurdurot audus)	2 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas, caurdurot audus)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta augšas un apakšas)	1,5 ml izopropanola (ekstrakcija no inserta apakšas)
Ekstrakcijas ilgums un temperatūra	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	2–3 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai pa nakti 4–10 °C temperatūrā	4 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT vai vismaz pa nakti bez kratīšanas 4–10 °C temperatūrā	Vismaz 2 h ar kratīšanu (~120 apgr./min) pie RT
OB rādījums	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (550–590 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra	570 nm (540–600 nm) bez references filtra
Audu kvalitātes kontrole	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) *Triton* X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Apstrāde ar 100 µl 0,3 % (tilpums/tipums) *Triton* X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml	30 min apstrāde ar SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

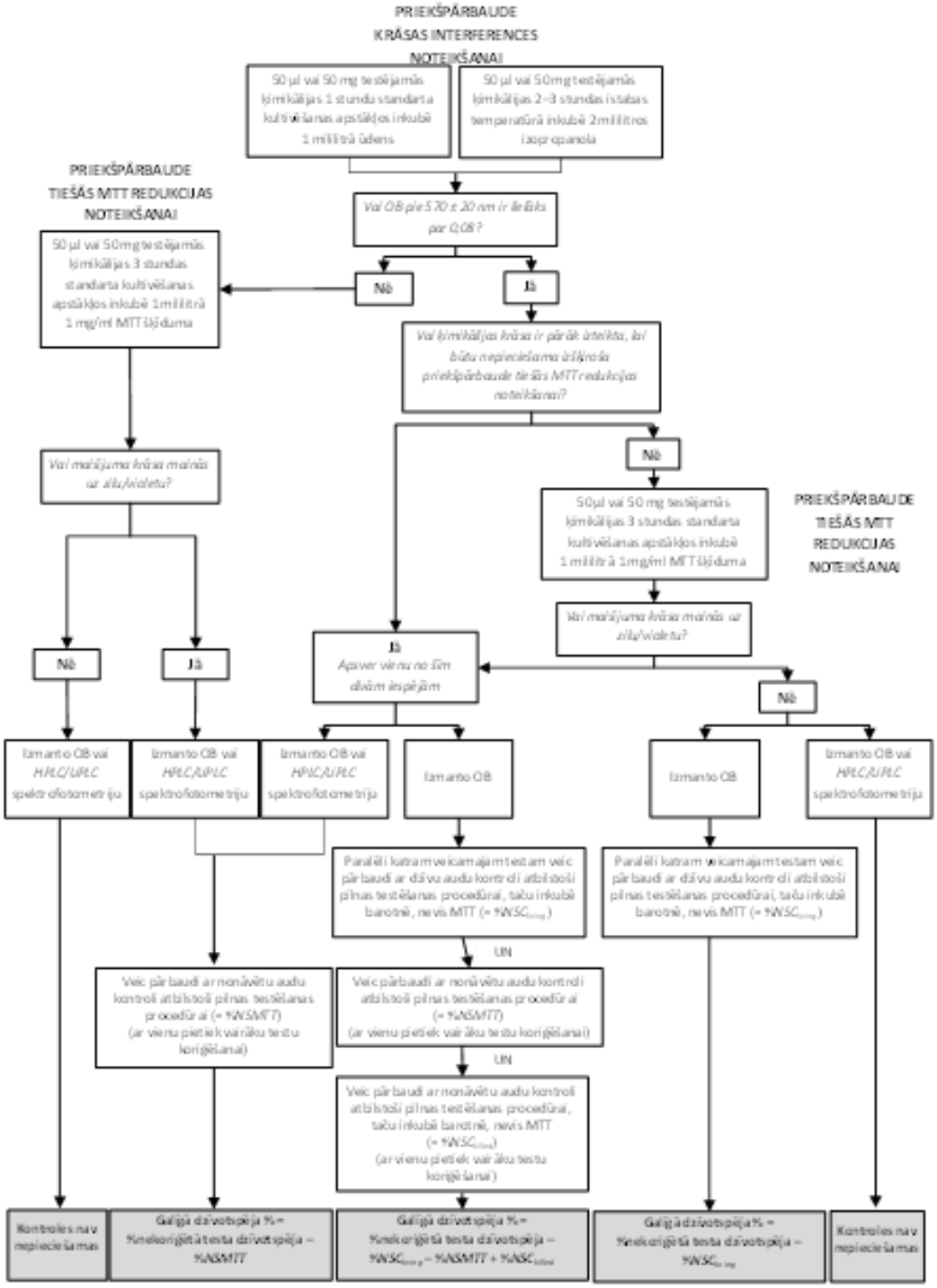
▼M8

Testa sastāvdaļas	EpiOcular™ *EIT* (*VRM1*)		SkinEthic™ *HCE EIT* (*VRM2*)	
Pieņemamības kritēriji	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 0,8 un < 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 0,8 un < 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 6 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt < 50 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 1,0 un ≤ 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 30 min eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 30 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.	1. Ar negatīvo kontroli apstrādāto audu replikātu vidējam OB jābūt > 1,0 un ≤ 2,5. 2. Ar pozitīvo kontroli 4 stundas eksponēto audu replikātu vidējai dzīvotspējai, kas izteikta kā % no negatīvās kontroles, jābūt ≤ 20 %. 3. Divu audu replikātu dzīvotspējas atšķirībai jābūt mazākai par 20 %.

▼**M8**

3. papildinājums

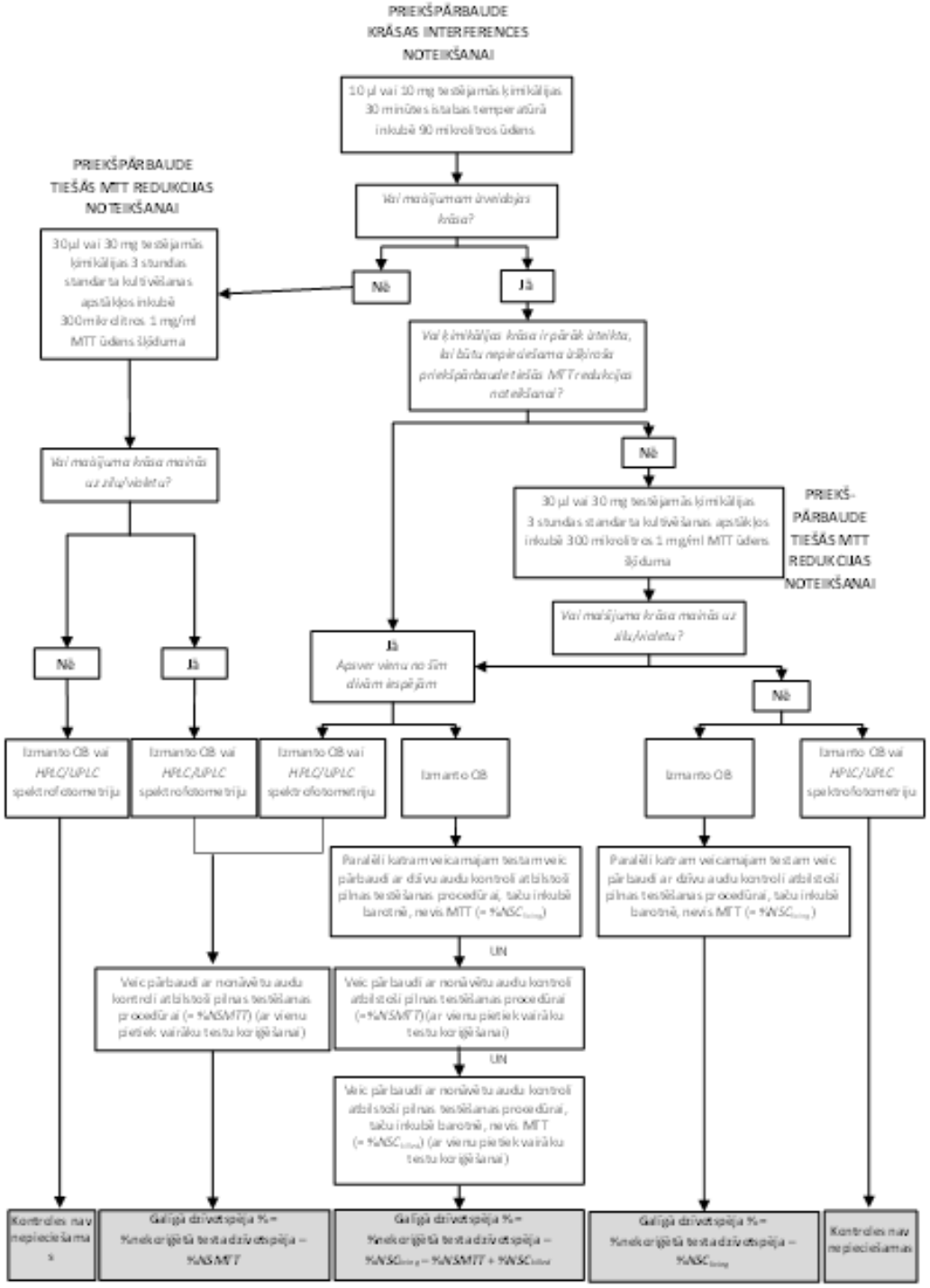
ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶIMIKĀLIJAS UN KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI *VRM1* STANDARTPROCEDŪRAI



▼**M8**

4. papildinājums

ILUSTRATĪVA DIAGRAMMA AR NORĀDĪJUMIEM PAR TO, KĀ IDENTIFICĒT TIEŠOS MTT REDUCĒTĀJUS UN/VAI KRĀSU INTERFERĒJOŠAS ĶIMIKĀLIJAS UN KĀ AR TĀM RĪKOTIES ATBILSTOŠI *VRM2* STANDARTPROCEDŪRAI



▼**M8**

5. papildinājums

GALVENIE PARAMETRI UN PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI NO *RhCE* AUDU KONSTRUKCIJĀM EKSTRAHĒTA MTT FORMAZĀNA MĒRĪŠANAI PAREDZĒTAS *HPLC*/*UPLC* SPEKTROFOTOMETRIJAS SISTĒMAS KVALIFICĒŠANAI

Parametrs	Saskaņā ar *FDA* norādījumiem izstrādāts protokols (36)(38)	Pieņemamības kritēriji
Selektivitāte	Izopropanola, dzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu dzīvu *RhCE* audu konstrukcijām), nedzīva tukšā parauga (izopropanola ekstrakts no neapstrādātu nonāvē*RhCE* audu konstrukcijām) un krāsas (piem., metilēnzilā) analīze	$Laukums_{interference} \leq 20$ % no $laukuma_{LLOQ}$ ([1])
Precizitāte	Kvalitātes kontroles (t. i., MTT formazāns koncentrācijā 1,6 μg/ml, 16 μg/ml un 160 μg/ml) izopropanolā (n=5)	*CV* ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 %
Pareizība	Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	% nov. ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 %
Matrices efekts	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=5)	85 % ≤ matrices efekts % ≤ 115 %
Pārnesums	Izopropanola analīze pēc *ULOQ* ([2]) standarta	$Laukums_{interference} \leq 20$ % no $laukuma_{LLOQ}$
Reproducējamība (tajā pašā dienā)	3 neatkarīgas kalibrēšanas līknes (balstītas uz 6 secīgiem MTT formazāna 1/3 atšķaidījumiem izopropanolā, sākot no *ULOQ*, t. i., 200 μg/ml); Kvalitātes kontroles izopropanolā (n=5)	Kalibrēšanas līknes: % nov. ≤ 15 % vai attiecībā uz *LLOQ* ≤ 20 % Kvalitātes kontroles: % nov. ≤ 15 % un *CV* ≤ 15 %
Reproducējamība (no vienas dienas otrā)	1. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 2. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3) 3. diena: 1 kalibrēšanas līkne un kvalitātes kontroles izopropanolā (n=3)	
MTT formazāna īslaicīgā stabilitāte *RhCE* audu ekstraktā	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc 24 stundu ilgas glabāšanas istabas temperatūrā	% nov. ≤ 15 %
MTT formazāna ilglaicīgā stabilitāte *RhCE* audu ekstraktā (ja vajadzīgs)	Kvalitātes kontroles dzīvā tukšajā paraugā (n=3), kas analizēts sagatavošanas dienā un pēc vairāku dienu ilgas glabāšanas -20°C temperatūrā	% nov. ≤ 15 %

([1]) LLOQ: apakšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas noteikta tā, lai aptvertu audu dzīvotspēju 1–2 %, proti, 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: augšējā kvantitatīvās noteikšanas robeža, kas saskaņā ar definīciju vismaz divreiz pārsniedz augstāko gaidāmo MTT formazāna koncentrāciju no negatīvajām kontrolēm iegūtos izopropanola ekstraktos (~70 μg/ml ar *VRM*), proti, 200 μg/ml.

▼M8

B.70. CILVĒKA REKOMBINANTIE ESTROGĒNRECEPTORU (*hr*ER) *IN VITRO* TESTI TĀDU ĶIMIKĀLIJU NOTEIKŠANAI, KAM PIEMĪT ER AFINITĀTE

VISPĀRĪGS IEVADS

Veiktspējā balstītas testēšanas ESAO vadlīnija

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 493 (2015). Minētā *TG* Nr. 493 ir veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnija (*PBTG*), kas apraksta cilvēka rekombinantās *in vitro* testēšanas metodiku tādu vielu noteikšanai, kam piemīt estrogēnreceptoru afinitāte (*hr*ER saistīšanās testi). Tajā ietilpst divas mehānistiski un funkcionāli līdzīgas testēšanas metodes, ko izmanto, lai identificētu vielas, kas saistās ar estrogēnreceptoru (t. i., ERα), un tā varētu atvieglot jaunu līdzīgu vai modificētu testēšanas metožu izstrādi atbilstīgi validēšanas principiem, kas izklāstīti ESAO vadlīniju dokumentā *Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). Šīs *PBTG* pamatā ir divas pilnībā validētas references testēšanas metodes (sk. 2. un 3. papildinājumu):

— Freibergera–Vilsona (*Freyberger–Wilson*; turpmāk *FW*) estrogēnreceptoru (ER) saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto pilnu cilvēka rekombinanto ERα (2), un

— Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūta (*Chemical Evaluation and Research Institute and Research Institute*; turpmāk "*CERI*") estrogēnreceptoru saistīšanās *in vitro* tests, kurā izmanto cilvēka rekombinanto liganda saistīšanās domēna proteīnu (2).

Ir izstrādāti veiktspējas standarti (VS) (3), kas sekmē līdzīgu testēšanas metožu izstrādi un validēšanu attiecībā uz to pašu bīstamības beigupunktu un dod iespēju savlaicīgi grozīt *PBTG* Nr. 493, atjaunināto *PBTG* ļaujot papildināt ar jauniem līdzīgiem testiem. Tomēr līdzīgus testus pievieno tikai pēc to izskatīšanas un ESAO apstiprinājuma, ka ir izpildīti veiktspējas standarti. Izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, *TG* Nr. 493 iekļautos testus bez izšķirības var izmantot, lai nodrošinātu ESAO dalībvalstu prasības pēc testēšanas rezultātiem attiecībā uz estrogēnreceptora saistīšanos.

Testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

2. ESAO 1998. gadā sāka īstenot prioritārus pasākumus ar mērķi pārskatīt esošās un izstrādāt jaunas testēšanas vadlīnijas potenciālo endokrīno disruptoru skrīningam un testēšanai. 2012. gadā tika pārskatīts ESAO potenciālo endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālais satvars (KS). Gan sākotnējais, gan pārskatītais KS ir iekļauts pielikumā Vadlīniju dokumentam par standartizētām testēšanas metodēm ķimikāliju vērtēšanai attiecībā uz potenciālu endokrīni disruptīvu iedarbību (4). KS aptver piecus līmeņus, no kuriem katrs atbilst citam bioloģiskās sarežģītības līmenim. Šajā testēšanas metodē aprakstītie ER saistīšanās testi atbilst 2. līmenim, kas ietver "*in vitro testus, kas sniedz datus par izvēlētiem endokrīniem mehānismiem/ceļiem*". Testēšanas metode paredzēta *in vitro* receptoru saistīšanās testiem, ar ko identificē cilvēka estrogēnreceptora alfa (ERα) ligandus.

▼**M8**

3. Ir skaidri pierādīts *in vitro* ER saistīšanās testa relevantums attiecībā uz bioloģiskajām funkcijām. ER saistīšanās testi izstrādāti, lai identificētu ķimikālijas, kam piemīt disruptīvs potenciāls attiecībā uz estrogēnu tipa hormonu ceļu, un pēdējo divdesmit gadu laikā tie plaši izmantoti, lai raksturotu ER audu izkliedi, kā arī identificētu ER agonistus/antagonistus. Šie testi atspoguļo ligandu–receptoru mijiedarbību, kas attiecībā uz reproduktīvo funkciju visiem mugurkaulniekiem ir estrogēnu signālceļa sākumpunkts.

4. Estrogēnu–ER mijiedarbība var ietekmēt estrogēnu regulēto gēnu transkripciju un inducēt negenomisku ietekmi, un tā rezultātā var tikt inducēti vai inhibēti šūnu procesi, tostarp tādi, kas saistīti ar šūnu vairošanos, normālu augļa attīstību un reproduktīvo funkciju (5)(6)(7). Normālu estrogēnisko sistēmu traucējumi var negatīvi ietekmēt normālu attīstību (ontoģenēzi), reproduktīvo veselību un reproduktīvās sistēmas integritāti. Neatbilstoši ER signāli var radīt, piemēram, palielinātu hormonatkarīgu audzēju risku, pasliktinātu auglību un mainītu augļa augšanas un attīstības gaitu (8).

5. *In vitro* saistīšanās testu pamatā ir vielu tieša vai netieša mijiedarbība ar specifisku receptoru liganda saistīšanās domēnu, kas regulē gēnu transkripciju. Cilvēka rekombinantā estrogēnreceptora alfa (*hr*ERα) saistīšanās testa galvenais komponents mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus un dokumentē ER specifiskumu, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

6. *CERI* validējošie pētījumi un *FW* saistīšanās testi ir pierādījuši, ka minētie komponenti ir relevanti un ticami paredzētajam nolūkam (2).

7. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

Receptora saistīšanās testu tvērums un ierobežojumi

8. Šie testi paredzēti skrīninga un prioritizēšanas vajadzībām, tomēr tie var sniegt arī informāciju par molekulāro iniciācijas notikumu (*MIE*), ko var izmantot pierādījumu svara pieejā. Šie testi *in vitro* sistēmā aplūko ķīmisko saistīšanos ar ERα liganda saistīšanās domēnu. Tāpēc rezultātus nevajadzētu tieši ekstrapolēt uz neskartas endokrīnās sistēmas kompleksajiem signalizēšanas un regulēšanas mehānismiem *in vivo*.

▼**M8**

9. Dabīgā liganda (17β-estradiola) saistīšanās ir sākumpunkts molekulāru notikumu sērijā, kas aktivizē mērķa gēnu transkripciju un galu galā kulminē ar fizioloģiskām pārmaiņām (9). Tādējādi saistīšanās ar ERα liganda saistīšanās domēnu tiek uzskatīta par vienu no svarīgākajiem ER mediētiem endokrīnās disrupcijas (ED) mehānismiem, lai gan pastāv arī citi ED izraisoši mehānismi, t. sk.: i) mijiedarbība ar citiem ERα domēniem, ne tikai ar liganda saistīšanās kabatu; ii) mijiedarbība ar citiem estrogēnu signalizēšanā būtiskiem receptoriem, ar ERβ un estrogēnreceptoru, kas sasaistīts ar G proteīnu, ar citiem endokrīnās sistēmas receptoriem un fermentu sistēmām; iii) hormonu sintēze; iv) metaboliska hormonu aktivācija un/vai inaktivācija; v) hormonu izkliede mērķaudos un vi) hormonu izvadīšana no organisma. Neviens šajā testēšanas metodē iekļautais tests neattiecas uz uzskaitītajiem iedarbības veidiem.

10. Šī testēšanas metode aplūko vielu spēju saistīties ar cilvēka ERα, un tā neizšķir ERα agonistus un antagonistus. Šajos testos netiek aplūkoti tādi tālāki lejupēji notikumi kā gēnu transkripcija vai fizioloģiskas pārmaiņas. Tā kā validācijā tika izmantotas tikai vienkomponenta vielas, nav informācijas par testa izmantojamību ar maisījumiem. Tomēr teorētiski šie testi ir izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Pirms testēšanas metodi attiecībā uz maisījumu izmanto, lai iegūtu datus kādai plānotai regulatīvai vajadzībai, jāapsver, vai un kādēļ tā var sniegt tādam nolūkam piemērotus rezultātus. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja pastāv regulatīva prasība maisījumu testēt.

11. Šūnas nesaturošām receptoru sistēmām nepiemīt iekšēja metaboliskā spēja, un tās nav validētas kombinācijā ar metaboliskām fermentu sistēmām. Pētījumu plānā gan varētu iekļaut metabolisku aktivitāti, bet tam būtu vajadzīga papildu validācija.

12. Nedrīkst testēt tādas ķimikālijas, kas varētu atņemt proteīna, proti, receptorproteīna, dabiskās īpašības (piem., virsmaktīvie aģenti) vai mainīt testa buferšķīduma pH, vai arī tās drīkst testēt tikai koncentrācijās, kas šādu mijiedarbību nepieļauj. Visos pārējos gadījumos testā izmantojamās testējamās ķimikālijas koncentrācijas diapazons ir atkarīgs no tās šķīdības testa buferšķīdumā.

13. Informatīvā nolūkā 1. tabulā ir sniegti testa rezultāti par 24 vielām, kas testētas ar abiem pilnībā validētajiem references testiem, kas aprakstīti šajā testēšanas metodē. No publicētajiem testēšanas pārskatiem t. sk. no *in vitro* testiem uz ER transkripcionālo aktivāciju un/vai uterotrofiskā testa izriet, ka 17 no šīm vielām klasificētas kā tādas, kas saistās ar ER, bet 6 vielas ir nesaistās ar ER (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Runājot par 1. tabulā apkopotajiem datiem, abu testu rezultāti gandrīz 100 % sakrita attiecībā uz visu vielu klasifikāciju līdz pat 10^{-4}M, un visas vielas bija pareizi klasificētas kā saistīgas vai nesaistīgas ar ER. Papildu informācija par šo vielu grupu un par citām vielām, kas validācijas pētījumu gaitā testētas ER saistīšanās testos, ir sniegta *hr*ER saistīšanās testa veiktspējas standartos (3), 2. papildinājumā (1., 2. un 3. tabulā).

▼M8

1. tabula

Vielu klasifikācija pēc to saistīšanās vai nesaistīšanās ar ER, testējot tās ar *FW* un *CERI hr*ER saistīšanās testiem, un salīdzinājums ar sagaidāmo rezultātu

	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
1	17β-estradiols	50-28-2	*saisteklis*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
2	Noretinodrels	68-23-5	*saisteklis*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
3	Noretindrons	68-22-4	*saisteklis*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
4	Di-*n*-butilftalāts	84-74-2	*nesaisteklis* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis (**) (†)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis (**) (†)	ogļūdeņradis (ciklisks), esteris	plastifikators, ķimikāliju starpprodukts
5	DES	56-53-1	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
6	17α-etinilestradiols	57-63-6	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
7	Mezo-heksestrols	84-16-2	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisks), flavonoīds	dabisks produkts

▼M8

	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
9	Ekvols	531-95-3	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	fitoestrogēna metabolīts	dabisks produkts
10	Butilparabēns (*n* butil-4-hidroksibenzoāts)	94-26-8	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	parabēns	konservants
11	Nonilfenols (maisījums)	84852-15-3	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	alkilfenols	starpproduktu savienojums
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	hlororganiska viela	insekticīds
13	Kortikosterons	50-22-6	*nesaisteklis* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	steroīds	dabisks produkts
14	Zearalenons	17924-92-4	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (heterociklisks), laktons	dabisks produkts
15	Tamoksifēns	10540-29-1	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (ciklisks)	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
16	5α-dihidrotestosterons	521-18-6	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	nefenolisks steroīds	dabisks produkts
17	Bisfenols A	80-05-7	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	fenols	ķimikāliju starpprodukts
18	4-*n*-heptilfenols	1987-50-4	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	neskaidra ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	alkilfenols	starpprodukts

▼M8

	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr.	Sagaidāmais rezultāts	*FW* tests		*CERI* tests		Klase pēc *MeSH* klasifikācijas	Produkta klase
				Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija	Koncentrācijas diapazons (M)	Klasifikācija		
19	Kepons (hlordekons)	143-50-0	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	ogļūdeņradis (halogenēts)	pesticīds
20	Benz(a)antracēns	56-55-3	*nesaisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nesaisteklis ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nesaisteklis ([b])	aromātiskais ogļūdeņradis	starpprodukts
21	Enterolaktons	78473-71-9	*saisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	saisteklis	fitoestrogēns	dabisks produkts
22	Progesterons	57-83-0	*nesaisteklis* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	steroīds	dabisks produkts
23	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	*nesaisteklis*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	nesaisteklis	silāns	virsmas modifikators
24	Atrazīns	1912-24-9	*nesaisteklis* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	nesaisteklis	heterociklisks savienojums	herbicīds

(*) Šķīdības robeža < 1×10^{-4}M.

(**) Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3}M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

([†]) Validēšanas pētījumā di-*n*-butilftalāts (DBP) tika testēts kā kodēta testējamā viela koncentrācijās līdz 10^{-3}M. Šādos testa apstākļos dažas laboratorijas novēroja vai nu radioaktīvi marķētā liganda saistīšanās samazinājumu pie augstākās koncentrācijas (10^{-3}M), vai/un neviennozīmīgi interpretējamu līkni. Šajās testēšanas reizēs DBP klasifikācija bija "neskaidra" vai tas tika klasificēts kā "saisteklis" trijās no piecām laboratorijām, kuras izmantoja *CERI* testu, un piecās no sešām laboratorijām, kuras izmantoja *FW* testu (sk. (2) atsauces IV.B.3a.,b. un VI.A. iedaļu).

([a]) Klasifikācija atšķirās no sagaidāmā rezultāta. Ņemot vērā, ka trijās no piecām laboratorijām 4-*n*-heptilfenola klasifikācija bija "neskaidra" vai tas tika klafisicēts kā "nesaisteklis", tā klasifikāciju definēja kā neskaidru. Sīkāka izpēte atklāja, ka šādu rezultātu izraisīja ķīmiskās šķīdības ierobežojums, kas neļāva izveidot pilnu saistīšanās līkni.

([b]) Validēšanas pētījuma gaitā, balstoties uz publicēto literatūru, kas pierāda, ka šai vielai paziņotā *in vitro* estrogēnu aktivitāte (16) primāri ir atkarīga no tās metaboliskās aktivācijas(17)(18), benz(a)antracēns tika pārkvalificēts par nesaistekli (t.i. negatīvs rezultāts). Šūnas nesaturošos *hr*ER saistīšanās testos, kādi izmantoti šajā starplaboratoriju validēšanas pētījumā, nav sagaidāma vielas fermentatīva metaboliskā aktivācija. Tādējādi šī viela būtu pareizi klasificējama par nesaistekli, kur to eksperimentālos apstākļos lieto *FW* un *CERI* testos.

▼M8

***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**

Nepieciešamie testa komponenti

14. Šī testēšanas metode attiecas uz testiem, kuru galvenais elements ir estrogēnreceptors (ER) un atbilstoša stipruma ligands, ko testā var izmantot kā marķieri / iezīmēto elementu un kas, palielinoties testējamās ķimikālijas koncentrācijai, var tikt pārvietots. Saistīšanās testu divi galvenie komponenti ir šādi: 1) piesātinājuma–saistīšanās tests un 2) konkurējošā saistīšanās. Piesātinājuma–saistīšanās testu izmanto, lai apstiprinātu receptoru preparātu specifiskumu un aktivitāti, savukārt konkurējošās saistīšanās eksperimenta mērķis ir izvērtēt testējamās ķimikālijas spēju saistīties ar *hr*ER.

Kontroles

15. Apraksta ierosinātos paralēlos references estrogēnus un kontroles. Paralēlās kontroles — šķīdinātājs (nesējs), pozitīvā kontrole (saistīgs ar ER; stipra un vāja afinitāte), negatīvā kontrole (nesaistīgs) — vajadzības gadījumā kalpo kā indikators, ka tests pie konkrētajiem testēšanas nosacījumiem funkcionē un ļauj savstarpēji salīdzināt eksperimentus; parasti paralēlās kontroles ir daļa no konkrētā eksperimenta pieņemamības kritērijiem (1). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs jāiekļauj: 1) katra E2 un vāja saistekļa augstas koncentrācijas (aptuveni tāda, pie kuras radioaktīvi marķētais ligands tiek pilnībā pārvietots) un vidējas koncentrācijas (aptuveni IC_{50}) triplikāti; 2) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikāti.

Standarta kvalitātes kontroles procedūras

16. Katram testam veic aprakstītās standarta kvalitātes kontroles procedūras, lai nodrošinātu, ka aktīvie receptori, pareizas ķīmiskās koncentrācijas un tolerances intervāli saglabājas stabili vairākkārtējās replikācijās un nezaudē spēju laika gaitā nodrošināt gaidītās ER saistīšanās reakcijas.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

17. Visām laboratorijām pirms nezināmu ķimikāliju testēšanas ar jebkuru no šīs testēšanas metodes testiem jāpierāda sava kvalifikācija konkrētā testa izmantošanā, veicot piesātinājuma testus, lai apstiprinātu ER preparāta specifiskumu un aktivitāti, un konkurējošās saistīšanās testus ar references estrogēniem un kontrolēm (vājiem saistekļiem un nesaistekļiem). Laboratorijai jāizveido vēsturiska datubāze, kurā apkopti trīs līdz piecu neatkarīgu, dažādās dienās veiktu eksperimentu rezultāti, kas gūti ar references estrogēnu un kontrolēm. Šie eksperimenti būs pamats laboratorijas references estrogēnam un vēsturiskajām kontrolēm, un turpmākās testēšanas reizēs tos izmantos kā testu pieņemamības novērtējuma daļu.

18. Jāapstiprina arī testa sistēmas reaģētspēja, izdarot 2. tabulā iekļauto standartvielu testēšanu. Standartvielu saraksts ir ER saistīšanās testu veiktspējas standartos norādīto references vielu apakškopa (3). Šīs vielas ir komerciāli pieejamas un ir attiecībā uz tādu ķimikāliju klasēm, ko parasti asociē ar ER afinitāti, reprezentatīvas, kā arī tām ir pienācīgs ER afinitātes diapazons (no spēcīgas līdz vājai), kāds būtu sagaidāms ER saistekļiem un nesaistekļiem (t. i., attiecībā uz negatīvajiem rezultātiem). Attiecībā uz katru standartvielu testētajām koncentrācijām būtu jāaptver 2. tabulā norādītais diapazons. Ar katru vielu jāveic vismaz trīs eksperimenti, un rezultātiem jāatbilst sagaidāmajai ķīmiskajai aktivitātei. Katrs eksperimentu veic neatkarīgi (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentu), katrai koncentrācijai izmantojot trīs replikātus. Kompetence ir pierādīta, ja katra standartviela tiek pareizi klasificēta (pozitīva/negatīva reakcija). Kompetences testēšanu atkārto katrs laborants, kas apgūst testēšanas metodi.

▼M8

2. tabula

***Hr* ER konkurējošās saistīšanās testu kontroļu un standartvielu saraksts** [1]

Nr.	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr. ([2])	Sagaidāmais rezultāts ([3]) ([4])	Testa koncentrācijas diapazons (M)	*MeSH* ķimikāliju klase ([5])	Produkta klase ([6])
Kontroles (references estrogēns, vājš saisteklis, nesaisteklis)						
1	17β-estradiols	50-28-2	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
2	Noretinodrels (vai) Noretindrons	68-23-5 (vai) 68-22-4	saisteklis	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
3	Oktiltrietoksisilāns	2943-75-1	nesaisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	silāns	virsmas modifikators
Standartvielas ([6])						
4	Dietilstilbestrols	56-53-1	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
5	17α-etinilestradiols	57-63-6	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	steroīds	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
6	Mezo-heksestrols	84-16-2	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks), fenols	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
7	Tamoksifēns	10540-29-1	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	ogļūdeņradis (ciklisks)	farmaceitisks un veterinārfarmaceitisks līdzeklis
8	Genisteīns	446-72-0	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	heterociklisks savienojums, flavonoīds	dabisks produkts
9	Bisfenols A	80-05-7	saisteklis	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	fenols	ķimikāliju starpprodukts
10	Zearalonons	17924-92-4	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	heterociklisks savienojums, laktons	dabisks produkts

▼M8

Nr.	Vielas nosaukums	*CAS* reģ. Nr. ([2])	Sagaidāmais rezultāts ([3]) ([4])	Testa koncentrācijas diapazons (M)	*MeSH* ķimikāliju klase ([5])	Produkta klase ([6])
11	Butilparabēns	94-26-8	saisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karbonskābe, fenols	konservants
12	Atrazīns	1912-24-9	nesaisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	heterociklisks savienojums	herbicīds
13	Di-*n*-butilftalāts (DBP) ([7])	84-74-2	nesaisteklis ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	ogļūdeņradis (ciklisks), esteris	plastifikators, ķimikāliju starpprodukts
14	Kortikosterons	50-22-6	nesaisteklis	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	steroīds	dabisks produkts

([1]) Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs.
([2]) *CERI* un *FW hr*ER saistīšanās testu validēšanas pētījumā klasificēts kā saistīgs ar ERαavai kā nesaisteklis (2).
([3]) ER saistīšanās aktivitāte ir balstīta uz "ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA assays" (9), kā arī uz empīriskiem datiem un citu informāciju, kas iegūta no publicētajiem un recenzētajiem atsauces pētījumiem (10) (11) (12) (13) (14) (15).
([4]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas priekšmetu klasifikatoru (*MeSH*), kas ir starptautiski atzīta, standartizēta klasifikācijas sistēma (pieejama http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([5]) Vielas iedalītas vienā vai vairākās ķimikāliju klasēs, izmantojot ASV Nacionālās medicīnas bibliotēkas bīstamo vielu datubāzi (pieejama http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).
([6]) Alternatīvi, ja testu veic ar maksimālo koncentrāciju 10^{-4} M, par nesaistekļa kontroli var izmantot DBP.
([7]) Šīs vielas šķīdības robeža ir 10^{-4} M. Di-*n*-butilftalāts (DBP) tiek lietots un klasificēts kā nesaisteklis, balstoties uz testēšanu koncentrācijā līdz 10^{-4} M, tāpēc ka pirmsvalidācijas pētījumos dažās laboratorijās pie 10^{-3}M koncentrācijas tika novērota vielas nešķīdība (t. i., tā kļuva duļķaina).

▼M8

Testējamo ķimikāliju šķīdības un koncentrācijas diapazona noteikšana

19. Ir jāveic sagatavošanās tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

Pieņemamības kritēriji katrai testēšanas reizei

20. Konkrēta eksperimenta pieņemšana vai noraidīšana notiek, izvērtējot rezultātus, kas iegūti ar references estrogēnu un kontroli. Pirmkārt, — attiecībā uz 1. plati — pilnām koncentrāciju līknēm, kas iegūtas ar katra eksperimenta references kontroli, jāatbilst līknei atbilstošajiem veiktspējas mērījumu parametriem (piem., IC_{50} un Hilla virziena koeficientam), balstoties uz rezultātiem, kas paziņoti attiecīgajos *CERI* un *FW* testu protokolos (2. un 3. papildinājums), un vēsturiskajiem kontroles datiem, ko apkopojusi testa veicēja laboratorija. Katrā eksperimentā jābūt pareizi klasificētām visām kontrolēm (references estrogēni, vāji saistekļi un nesaistekļi). Otrkārt, visās turpmākajās platēs ir jāvērtē kontroles konsekventums attiecībā pret 1. plati. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu. Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām testēšanas reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Laboratorija savu spēju konsekventi veikt testu pierāda, izveidojot un uzturot vēsturisku datubāzi, kurā apkopoti references estrogēnu un kontroļu rezultāti. Lai nodrošinātu reproducējamību laboratorijas ietvaros, var izmantot references estrogēna un vāja saistekļa kontroles līknēm atbilstošo parametru vidējo vērtību standartnovirzes (SN) vai variācijas koeficientus (VK), kas iegūti daudzos eksperimentos. Katrā testēšanas reizē iegūtos plates kontroļu rezultātus, kā arī ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam.

Bez tam attiecībā uz pieņemamības kritērijiem ir jāievēro šādi principi:

— datiem jābūt pietiekamiem, lai varētu kvantitatīvi novērtēt ER saistīšanos;

— testētajām koncentrācijām jāsaglabājas testējamās ķimikālijas šķīdības diapazonā.

Datu analīze

21. Definētajai datu analīzes procedūrai attiecībā uz piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās datiem jāatbilst pamatprincipiem, ko izmanto receptora–liganda mijiedarbības raksturošanai. Parasti piesātinājuma–saistīšanās datus analizē, izmantojot nelineāru regresijas modeli, kas atspoguļo gan kopējo, gan nespecifisko saistīšanos. Iespējams, ka, nosakot *Bmax* un *Kd*, vajadzēs izmantot liganda noplicināšanās korekciju (piem., *Swillens*, 1995 (19)). Datus no konkurējošās saistīšanās testiem parasti transformē (piem., procentuālā specifiskā saistīšanās un testējamās ķimikālijas koncentrācija (log M)). Katras

(1) Ja standartviela vairs nav komerciāli pieejama, var izmanot vielu, kurai ir tāda pati ER saistīšanās klasifikācija, salīdzināma potence un ķīmiskā klase.

▼M8

testējamās ķimikālijas aplēstais log (IC_{50}) ir jānosaka, izmantojot piemērotu nelineāras līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem. Pēc sākotnējās analīzes jāpārbauda, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli jānosaka, cik precīzi saistīšanās dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Dažos gadījumos, lai panāktu precīzāko atbilstību līknei, var būt jāveic papildu analīze (piem., ierobežojot līknes augšējo un/vai apakšējo punktu, izmantojot 10 % kritēriju, sk. 4. papildinājumu un 2. atsauci (III.A.2. iedaļa).

22. Ja ir izpildīti pieņemamības kritēriji (20. punkts), tas nozīmē, ka testa sistēma darbojas pareizi, tomēr tas negarantē, ka konkrētajā testā tiks iegūti pareizi dati. Labākais pierādījums iegūto datu pareizībai ir pareizu pirmā izpildītā testa rezultātu replicēšana.

Vispārīgie datu interpretācijas kritēriji

23. Pašlaik nav vispārpieņemtas metodes, kā interpretēt ER saistīšanās datus. Tomēr visi *hr*ER-mediētas aktivitātes kvalitatīvie (piem., saisteklis/nesaisteklis) un/vai kvantitatīvie (piem., log IC_{50}, relatīvā afinitāte (*relative binding affinity — RBA*), utt.) novērtējumi jābalsta uz empīriskiem datiem un pamatotiem zinātniskiem spriedumiem.

Testēšanas pārskats

24. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Tests:

— izmantotais tests.

Kontroles/references/testējamā ķimikālija:

— avots, sērijas numurs, izmantošanas termiņš, ja pieejams;

— pašas testējamās ķimikālijas stabilitāte, ja zināma;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā, ja zināma;

— (attiecīgā gadījumā) pH, osmolalitātes un nogulsnēšanās mērījums kultūras barotnē, kurā testējamā ķimikālija pievienota.

Vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļošs raksturojums, norādot sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo saturu un relevantās fizikālķīmiskās īpašības.

▼**M8**

Šķīdinātājs/nesējs:

— raksturojums (veids, piegādātājs un sērija);

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums;

— testējamās ķimikālijas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja zināma.

Receptori:

— receptoru avots (piegādātājs, kataloga Nr., sērija, receptora suga, piegādātāja nodrošinātā aktīvo receptoru koncentrācija, piegādātāja sertifikāts);

— receptoru raksturojums (ieskaitot piesātinājuma–saistīšanās rezultātus): *Kd*, *Bmax*;

— receptoru uzglabāšana;

— radioaktīvi marķētais ligands:

— piegādātājs, kataloga Nr., sērija, specifiskā aktivitāte.

Testēšanas apstākļi:

— šķīdības ierobežojums konkrētā testa apstākļos;

— saistīšanās buferšķīduma sastāvs;

— receptora koncentrācija;

— iezīmētā elementa (t. i., radioaktīvi marķētā liganda) koncentrācija;

— testējamās ķimikālijas koncentrācijas;

— nesēja saturs (procentuāli) galīgajā testā;

— inkubācijas temperatūra un ilgums;

— metode ar kuru nosaka, vai saistīts/brīvs;

— pozitīvās un negatīvās kontroles/references vielas;

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Pieņemamības pārbaude

— faktiskās IC_{50} un Hilla virziena koeficienta vērtības paralēlajām pozitīvajām kontroles/references vielām.

Rezultāti:

— jēldati un saistītie/brīvie dati;

— denaturēta apstiprinoša pārbaude (attiecīgā gadījumā);

— zemākā iedarbīgā koncentrācija (*LEC*), ja tāda ir;

— RBA un/vai IC_{50} vērtība (attiecīgā gadījumā);

— ja iespējams, koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība;

— statistiskās analīzes (attiecīgā gadījumā), kā arī kļūdas un ticamības mērs (piem., vidējās vērtības standartnovirze (*SEM*), standartnovirze (SN), variācijas koeficients (VK) vai 95 % ticamības intervāls (*CI*)) un apraksts, kā šīs vērtības iegūtas.

▼**M8**

Rezultātu iztirzājums:

— 10 % kritērija piemērošana.

Secinājums

LITERATŪRA

(1) 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(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): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**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, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN SAĪSINĀJUMI

10 % kritērijs: izvēle no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz pie zemākas koncentrācijas iegūto vidējo vērtību (sk. 4. papildinājumu).

Pieņemamības kritēriji: minimālie standarti, kas attiecas uz eksperimenta kontrolēm un references standartiem. Lai eksperimentu uzskatītu par derīgu, visiem pieņemamības kritērijiem jābūt izpildītiem.

Pareizība (konkordantums): pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām atsauces vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (1).

KS: ESAO konceptuālais satvars (KS) endokrīno disruptoru testēšanai un izvērtēšanai.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

VK: variācijas koeficients.

E2: 17β-estradiols.

ED: endokrīnā disrupcija.

***hER α*:** cilvēka estrogēnreceptors alfa.

ER: estrogēnreceptors.

Estrogēniskā aktivitāte: ķimikālijas spēja imitēt 17β-estradiolu, proti, saistīties ar estrogēnreceptoriem. Ar šo testēšanas metodi var konstatēt saistīšanos ar *hERα*.

IC 50: testējamās inhibējošās ķimikālijas 50 % efektīvā koncentrācija.

***ICCVAM*:** Alternatīvo metožu validēšanas koordinēšanas starpaģentūru komiteja.

Starplaboratoriju reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vairākas kvalificētas laboratorijas spēj iegūt kvalitatīvi un kvantitatīvi līdzīgus rezultātus, ja tās izmanto vienu un to pašu protokolu un vienas un tās pašas testējamās vielas. Starplaboratoriju reproducējamību (saukta arī par "interlaboratoriju reproducējamību") nosaka prevalidēšanas un validēšanas procesā, un šis lielums rāda, cik lielā mērā testēšanu vienlīdz sekmīgi iespējams veikt dažādās laboratorijās (1).

Iekšlaboratorijas reproducējamība: lielums, kas raksturo, kādā mērā vienā laboratorijā strādājoši kvalificēti darbinieki spēj sekmīgi atkārtot iepriekš iegūtus rezultātus, ja to pašu protokolu izmanto citā laikā. Saukts arī par "intralaboratoriju reproducējamību" (1).

***LEC*:** zemākā iedarbīgā koncentrācija ir zemākā koncentrācija, kurā testējamā ķīmikālija izraisa reakciju (t. i., testējamās ķimikālijas zemākā koncentrācija, pie kuras indukcijas reizinājums ir statistiski atšķirīgs no paralēlās nesēja kontroles).

▼M8

Atdarinājuma tests: sadzīvisks apzīmējums testam, kas ir noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgs validētai un pieņemtai testēšanas references metodei. Brīvi aizstājams ar līdzīgu testēšanas metodi.

***PBTG*:** veiktspējā balstītas testēšanas vadlīnijas.

Veiktspējas standarti: uz validētu testēšanas metodi bāzēti standarti, pēc kuriem izvērtē noteikšanas mehānisma vai funkcionalitātes ziņā līdzīgu testu salīdzināmību. Tie ietver: 1) nepieciešamos testa komponentus; 2) minimālo tādu references ķimikāliju sarakstu, kuras izraudzītas no citām ķimikālijām, ko izmanto, lai pierādītu pieņemamu validētās testēšanas metodes veiktspēju; kā arī 3) uz attiecīgajā validētajā testēšanas metodē iegūto rezultātu pamata — salīdzināmus pareizības un ticamības līmeņus, kādi būtu jāiegūst ar ierosināto testu, to izvērtējot ar references ķimikālijām no minimālā saraksta (1).

Standartvielas: veiktspējas standartos iekļauto references vielu apakškopa, ko laboratorijas var izmantot, lai pierādītu savu tehnisko kompetenci ar standartizētu testu. Šādu vielu atlases kritēriji parasti ir, piemēram šādi: viela ir reprezentatīva dažādām reakcijām, ir komerciāli pieejama un par to pieejami ļoti kvalitatīvi references dati.

Kompetence: vēl pirms nezināmu vielu testēšanas pierādīta spēja pienācīgi veikt testu.

References estrogēns: 17ß-estradiols (E2, *CAS* 50-28-2).

References testēšanas metodes: testi, uz kuriem balstās *PBTG* Nr. 493.

***RBA*:** relatīvā afinitāte. Vielas *RBA* aprēķina kā procentuālu vērtību no vielas log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}).

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Tā ir pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (1).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās pēc vienu un tā paša protokola var ilgstoši reproducējami veikt konkrētu testu. To novērtē, aprēķinot reproducējamību vienā laboratorijā un vairākās laboratorijās.

SN: standartnovirze.

Testējamā ķimikālija: viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

Validēta testēšanas metode: tests, kura relevantums (ieskaitot pareizību) un ticamība attiecībā uz lietošanu konkrētā nolūkā ir pārbaudīta validācijas pētījumos. Jāievēro, ka validētas testēšanas metodes veiktspēja pareizības un ticamības ziņā var nebūt pietiekama, lai to izmantotu paredzētajam nolūkam (1).

Validācija: Process, kurā nosaka, kādā mērā konkrēta pieeja, metode, tests, process vai novērtējums ir ticams un relevants konkrētajam nolūkam (1).

▼**M8**

2. papildinājums

FREIBERGERA–VILSONA IN VITRO TESTI, KAS BALSTĀS UZ PIESĀTINĀJUMU UN KONKURĒJOŠO SAISTĪŠANOS AR ESTROGĒNRECEPTORU (ERA) UN KUROS IZMANTO PILNU REKOMBINANTO ERA

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis *in vitro* piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās ar estrogēnreceptoriem (ERα) tests izmanto pilnu cilvēka receptoru — ERαα(*hr*ERα) —, iegūtu un izolētu no insektu šūnām, kuras inficētas ar bakulovīrusu. Freibergera un Vilsona izstrādātajam protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.

2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar pilnu *hr*ERα. To izmanto, lai noteiktu testējamās ķimikālijas spēju konkurēt ar 17β-estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hr*ERα. Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC_{50} (mērs, kas rāda testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hr*ERα pārvietotu pusi no [^{3}H]-17β-estradiola) un testējamo ķimikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hr*ERα salīdzinājumā ar 17β-estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķimikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hr*ERα vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.

3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķimikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *Hr*ERα saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t. i., konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti.

6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, *Kd*), un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (*Bmax*).

▼M8

8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar [^{3}H]17β-estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā "50 % inhibējošo koncentrāciju" vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (*RBA*, relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50}, ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas [^{3}H]17β-estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķimikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hr*ERα proteīna veiktspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hr*ERα partiju ir jāpierāda to veiktspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veiktspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,

— veic [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās–piesātinājuma testu, lai pierādītu specifiskumu attiecībā uz *hr*ERα un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda (*Scatchard*) diagrammu dokumentē *hr*ERα spēju saistīt [^{3}H]-17β-estradiolu (*Kd*) un katras partijas receptoru skaitu (*Bmax*);

— veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu)), vāju saistekli (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistekli (oktiltrietoksisilānu (OTES)). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekventumu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hr*ERα partijām. Ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula.

References estrogēna un vāja saistekļa veiktspējas kritēriji, kas izstrādāti *FW* hrER saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	augstākais (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	zemākais (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hilla virziena koeficients	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
Noretinodrels	augstākais (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	zemākais (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hilla virziena koeficients	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindrons[c] ([c])	augstākais (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	zemākais (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hilla virziena koeficients	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) Vidējā vērtība (n) ± standartnovirze (SN) kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauces N pielikumu).

([b]) 95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

([c]) Validēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu veikšanas reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).
IC_{50} *diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta Kd un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama* IC_{50} *diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.*

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hr*ERα) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.

12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 1 nM [^{3}H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,25, 0,5, 0,75 un 1 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarķēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo nominālo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hr*ER koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,5 nM.

▼M8

13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 20 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 20 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [^{3}H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):

— testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [^{3}H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;

— testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas tūkstoškārt pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;

— testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[^{3}H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu sagatavošana

15. Buferšķīdumam pievienojot 12 nM [^{3}H]-17β-estradiola izejšķīduma, sagatavo [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumus, kuru sākotnējās koncentrācijas ir 0,12nM–12 nM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 līdz 3,0 nM iegūst, 40 µl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (beigu tilpums 160 µl). Testa buferšķīduma, [^{3}H]-17β-estradiola izejšķīduma un atšķaidījumu sagatavošana, kā arī koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).

16. Atšķaidījumus no etanolu saturoša 17β-estradiola šķīduma sagatavo, pievienojot tam testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,06 µM līdz 6 µM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,03 µM līdz 3 µM iegūst, 80 µl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (beigu tilpums 160 µl). Nemarķētā 17β-estradiola galīgajai koncentrācijai atsevišķās nespecifiskās saistīšanās testa iedobēs jābūt tūkstoškārt lielākai par marķētā [^{3}H]-17β- estradiola koncentrāciju. Nemarķēta 17β-estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *FW* testa protokolā (2).

17. Izmanto receptora nominālo koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 20±5 % (sk. 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 2.2. papildinājumā sniegts piemērs [^{3}H]-17β-estradiola, nemarķēta 17β-estradiola, buferšķīduma un receptora koncentrācijām un tilpumiem testa platē.

▼M8

2. tabula.

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	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			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
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 [^{3}H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifiskā saistīšanās
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-estradiols
ER:: estrogēnreceptors
E2:: nemarķēts 17β-estradiols

19. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

Ar hrERα saistītā [^{3}H]-17β-estradiola mērīšana

20. [^{3}H]-17β-estradiolu, kas piesaistījies *hr*ERα, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola atdala, katrā iedobē pievienojot 80 μl aukstas DCC suspensijas, tad 10 minūtes kratot mikrotitrēšanas plates un 10 minūtes centrifugējot ar aptuveni 2 500 apgr./min. Lai procedūras gaitā nepieļautu [^{3}H]-17β-estradiola atdalīšanos no *hr*ERα, kam tas piesaistījies, ir ļoti svarīgi buferšķīdumus un testa iedobes turēt 2 līdz 8°C temperatūrā un katru testa soli veikt ātri. Lai plates varētu apstrādāt ātri un efektīvi, ir vajadzīgs mikrotitrēšanas plašu kratītājs.

21. Ņem 50 μl supernatanta, kas satur ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, un novieto uz otras mikrotitrēšanas plates; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontamināciju, saskaroties DCC.

22. Pēc tam katrai iedobei (A1–B12 un D1–E12) pievieno 200 μl scintilācijas šķidruma, kas kodolemisiju kinētisko enerģiju spēj pārveidot gaismas enerģijā. Katrā no G1–H12 (kopējam *dpm* atbilstošajām) iedobēm iepilina 40 μl [^{3}H]-17β-estradiola sērijveida atšķaidījuma; tam jānokļūst tieši scintilācijas šķīdumā mērījumu plates iedobēs atbilstoši 3. tabulas norādījumiem, proti, šajās iedobēs jābūt tikai 200 μl scintilācijas šķidruma un atbilstošam [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumam. Ar šiem mērījumiem pierāda, cik daudz [^{3}H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

▼M8

3. tabula.

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, radioaktivitātes mērījums

	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			Kopējā saistīšanās (šķīdinātājs)
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 E22			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER+ 0,10 μM E2			Nespecifiskā saistīšanās
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 [^{3}H] E2 (kopējais *dpm*)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			(kopējais *dpm* (*))
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-estradiols
ER:: estrogēnreceptors
E_2:: nemarķēts 17β-estradiols
dpm:: sabrukumu skaits minūtē
(*) Šeit karstie marķētā [^{3}H]-estradiola sērijveida atšķaidījumi tieši jāpievieno 200 μl scintilācijas šķīduma G1–H12 iedobēs.

23. Mērījumu sāk ne mazāk kāpēc divu stundu ilgas nogaidīšanas, un skaitīšanas laiks katrai iedobei ir 40 minūtes. Nosakot *dpm* uz iedobi un piemērojot slāpēšanas korekciju, izmanto mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītāju. Ja mikrotitrēšanas plates scintilāciju skaitītājs nav pieejams, paraugu skaitīšanai var izmantot parasto skaitītāju. Šādā gadījumā var apsvērt skaitīšanas laika samazināšanu.

Konkurējošās saistīšanās tests

24. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

25. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) katra E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontroles un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [^{3}H]-17β-estradiola, *hr*ERα un testējamo ķimikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir aprakstītas 2. atsaucē (sk. *FW* testa protokolu K pielikumā).

▼**M8**

Šķīdinātāja kontrole

26. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar "TB" — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir etanols. Ja testējamās ķimikālijas visaugstākā koncentrācija etanolā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot dimetilsulfoksīdu ("DMSO"). Galīgajā testā etanola vai attiecīgā gadījumā DMSO koncentrācijai iedobēs jābūt 1,5 % un ne vairāk kā 2 %.

Buferšķīduma kontrole

27. Buferšķīduma kontrole ("BC") nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķimikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

28. 17β-estradiols (*CAS* 50-28-2) ir endogēnisks ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hr*ERα konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17β-estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17β-estradiola šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu no 100 nM–10 pM (-7[logM] līdz -11[logM]), ar šādiem intervāliem: (-7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). Nemarķēta 17β-estradiola (1 μM) augstākā koncentrācija kalpo arī kā nespecifiskās saistīšanās (*NSB*) indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu "NSB", lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

29. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (*CAS* 68-23-5) vai noretindronu (*CAS* 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 3 nM–30 pM (no -8,5[logM] līdz -4,5[logM]), ar šādiem intervāliem: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Nesaisteklis

30. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, *CAS*2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķimikālijas, kas nesaistās ar *hr*ERα. Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus etanolā tā, lai testa iedobēs šķīdumu koncentrācija būtu 0,1 nM–1 000 μM (no -10[logM] līdz -3[logM]), ar logaritmisku palielinājumu. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP). Ir pierādīts, ka tā maksimālā šķīdība testā ir -4[logM].

HrERα koncentrācija

31. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 20±5 % no 1 nM radioaktīvi marķētā liganda (sk. 2. papildinājuma 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

[^{3}H]-17β-estradiols

32. [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācija testa iedobēs ir 1,0 nM.

▼M8

Testējamās ķimikālijas

33. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 35. punktu). Testējamo ķimikāliju testē, izmantojot līkni ar astoņām log koncentrācijām un diapazona noteikšanas testā identificētajiem intervāliem. Trešā un ceturtā eksperimenta koncentrācijas būtu jāpielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

34. Testējamās ķimikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 2. papildinājuma 26. punktu). Ja testējamās ķimikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne etanolā, ne DMSO un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju diapazona apakšā. Visas pārējas sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.

35. Pievienojot testējamās ķimikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.

36. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķimikālijas log (IC_{50}), atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot (t. i., pa 0,5 log vienībām ap paredzamo log (IC_{50}). Galīgajam rezultātam būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

37. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole un references estrogēns visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju; un pa trim šādiem kodētiem inkubētiem replikātiem: astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas references estrogēna zemākās koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa devas līmeņa koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķimikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamām ķimikālijām, un tajās jāiekļauj testa plates kontroles, t. i., 1) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni

▼M8

IC_{50}); 2) šķīdinātāja kontrole un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma darblapas paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķimikālijām ir dots 2.3. papildinājumā. 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas ir galīgās testa koncentrācijas. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotirēšanas platē izmantota vājam saisteklim. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija, balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

4. tabula.

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			NSB			NSB		
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)			Tukša iedobe (*)		
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	tukša iedobe (karsta) (**)			tukša iedobe (karsta) (**)			Buferšķīduma kontrole			Buferšķīduma kontrole		

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").
(*) Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.
(**)Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula.

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, pilnas testējamo ķimikāliju un plates kontroļu koncentrāciju līknes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (tikai šķīdinātājs)			TB (tikai šķīdinātājs)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE (1×10-4,5)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10-7)		

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

▼M8

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

38. Kā parādīts 6. tabulā, katrā testēšanas iedobē pievieno 80 µl šķīdinātāja kontroles, testa buferšķīduma kontroles, references estrogēna, vāja saistekļa, nesaistekļa un testa buferšķīdumā sagatavotas testējamās ķimikālijas. Pēc tam katrā iedobē pievieno 40 µl 4 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma. 10 līdz 15 minūtes viegli rotē 2–8°C temperatūrā, pēc tam pievieno 40 µl *hr*ERα šķīduma. Testa mikrotitrēšanas plates 16 līdz 20 stundas inkubē 2° līdz 8°C temperatūrā un inkubācijas periodā novieto rotatora.

6. tabula.

_Hr_ER konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs

Tilpums (µl)	Komponents
80	Nemarķēts 17β-estradiols, noretinodrels, OTES, testējamās ķimikālijas, šķīdinātājs vai buferšķīdums
40	4 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma
40	*hr*ERα šķīdums ar noteiktu koncentrāciju
160	***Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē***

39. Pēc tam (saskaņā ar piesātinājuma–saistīšanās testa apraksta 20.–23. punktu) kvantificē ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 80 µl aukstas DCC suspensijas, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola atdala ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu/

40. Iedobes H1–6 (sk. aili "Tukša iedobe (karsta)" 4. tabulā) raksturo marķēta [^{3}H]-estradiola *dpm* 40 µl. 40 µl alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā iedobēs H1–H6.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

41. Ja tiek izmantotas pieaugošas [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar ligandu.

42. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 1 nM [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 15–25 % no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.

43. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.

44. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

▼**M8**

Konkurējošās saistīšanās tests

45. Pie pieaugošām nemarķēta 17β-estradiola koncentrācijām [^{3}H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.

46. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC_{50} vērtībai jābūt aptuveni vienādai ar [^{3}H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*Kd*).

47. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (20 ± 5 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 1 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.

48. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.

49. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10^{-3} M (OTES) vai 10^{-4} M (DBP), nesaisteklim nevajadzētu no *hr*ERα pārvietot vairāk nekā 25 % [^{3}H]-17β-estradiola.

50. Izmantojot *FW hr*ER saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsauces N pielikums), tika izstrādāti references estrogēna un divu vāju saistekļu (piem., noretinodrels, noretindrons) veiktspējas kritēriji. Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām (n) +/- SN; tās tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un log IC_{50}) un vāju saistekļu $\log_{10}$ *RBA* attiecībā pret references estrogēnu; tos izmanto par pozitīvās kontroles veiktspējas kritērijiem. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veiktspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no receptora preparāta *Kd* un liganda koncentrācijas.

51. Testējamo ķimikāliju līknes pielāgošanas parametriem veiktspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķimikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i., 90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju, mērījumiem būtu jātuvojas veiktspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *FW* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

▼M8

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

52. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šim vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar [^{3}H]-17β-estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē [^{3}H]-17β- estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.

53. Analizējot datus, *Bmax* un *Kd* nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot *Bmax* un *Kd* no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

54. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

55. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 2. papildinājuma 45.–50. punktā.

56. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķimikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 55. punktu iepriekš tekstā). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

▼M8

Datu interpretācija

57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par saistīgu ar *hr*ERα, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).

58. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par nesaistīgu ar *hr*ERα, ja:

— saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai

— saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.

59. Testējamās ķimikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

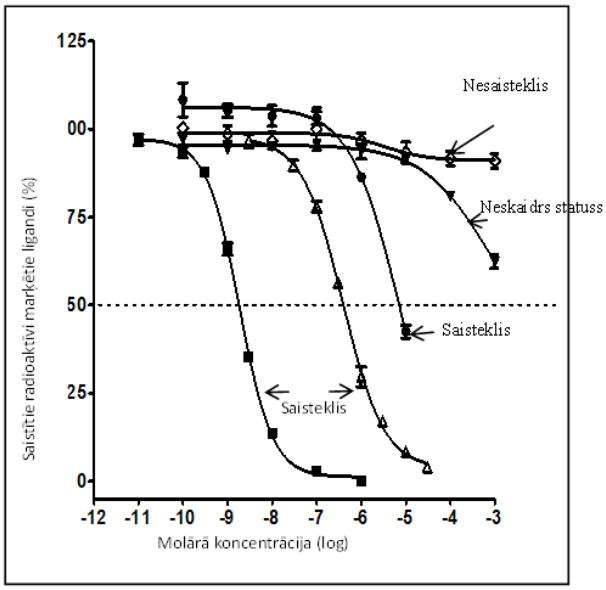
7. tabula.

Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis[a]	Saistīšanās līkni var pielāgot. **Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.**
Nesaisteklis[b]	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, **pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %.** Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, **visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.**
Neskaidra[c]	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķimikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

1. attēls.

Piemēri, kā klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



▼**M8**

60. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķimikālijas klasifikāciju.

8. tabula.

Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķimikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0
Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	Vidēji ≥ 1,5
Neskaidrs	0,5 ≤ Vidējā vērtība < 1,5
Nesaisteklis	Vidēji < 0,5

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 24. punktu.

▼**M8**

2.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[^{3}H]E2: 17β-estradiols, radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums:: 10 mM tris, 10 mg liellopu seruma albumīna/ml, 2 mM DTT, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna (pH 7,5).

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa.

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķimikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto miktotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķimikālijas saistīšanos ar *hr*ERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [^{3}H]-17β-estradiols, maksimālā [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās ar *hr*ERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķimikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa ar katru ķimikāliju veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes.

▼**M8**

2.2. papildinājums

TIPISKS [^{3}H]-17B-ESTRADIOLA PIESĀTINĀJUMA TESTS AR TRIJĀM REPLIKĀTA IEDOBĒM

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm

Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (µl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)	Auksta E2 tilpums (µl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Receptora tilpums (µl)	Kopējais tilpums iedobēs
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm

Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (µl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)	Auksta E2 tilpums (µl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Receptora tilpums (µl)	Kopējais tilpums iedobēs
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm

Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (µl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)	Auksta E2 tilpums (µl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Receptora tilpums (µl)	Kopējais tilpums iedobēs
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Karsta	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Karsta	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Karsta	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Karsta	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Tipisks [^{3}H]-17β-estradiola piesātinājuma tests ar trijām replikāta iedobēm

Pozīcija	Replikāts	Iedobes tipa kods	Karsta E2 sākotnēja koncentrācija (nM)	Karsta E2 tilpums (µl)	Karsta E2 beigu koncentrācija (nM)	Auksta E2 sākotnēja koncentrācija (µM)	Auksta E2 tilpums (µl)	Auksta E2 beigu koncentrācija (µM)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Receptora tilpums (µl)	Kopējais tilpums iedobēs
H1	1	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Karsta	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Karsta	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Karsta	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Karsta	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Piezīme: "karstās" iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

▼**M8**

2.3. papildinājums

KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA IEDOBJU IZKĀRTOJUMS

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	auksts E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	B5	2	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	auksts E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	auksts E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	auksts E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	auksts E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	C9	3	auksts E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tukša	tukša	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	tukša	tukša	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	tukša	tukša	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrels	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrels	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrels	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrels	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	E8	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrels	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	noretinodrels	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrels	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**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	hrER izejšķīdums (µl)	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (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	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	karsta	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Piezīme: “karstās” iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 40 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

▼M8

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	***hr*ER izejšķidums (µL)**	**Buferšķīduma tilpums (µL)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
P1	A1	1	kopējā saistīšanās	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	***hr*ER izejšķīdums (µL)**	**Buferšķīduma tilpums (µL)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
P1	C1	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	testējamā ķimikālija 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	***hr*ER izejšķīdums (µL)**	**Buferšķīduma tilpums (µL)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
P1	E1	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	testējamā ķimikālija 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Konkurējošās saistīšanās testa iedobju izkārtojums												
Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	***hr*ER izejšķīdums (µL)**	**Buferšķīduma tilpums (µL)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
P1	G1	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	testējamā ķimikālija 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrels	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrels	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	auksts E2 S			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	auksts E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

3. papildinājums

ĶĪMISKĀS IZVĒRTĒŠANAS UN PĒTNIECĪBAS INSTITŪTA (*CERI*) ESTROGĒNRECEPTORU SAISTĪŠANĀS *IN VITRO* TESTS, KURĀ IZMANTO CILVĒKA REKOMBINANTO ERα LIGANDA SAISTĪŠANĀS DOMĒNA PROTEĪNU

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

1. Šis estrogēnreceptora (ERα) piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās *in vitro* tests izmanto cilvēka ERα liganda saistīšanās domēnu (*LBD*). Šo proteīnu modeli izstrādājis Ķīmiskās izvērtēšanas un pētniecības institūts (*CERI*) Japānā, un tas eksistē kā glutationa-S-transferāzes (GST) jauktais proteīns, kuru ekspresē *E. coli*. *CERI* protokolam veikts starptautisks daudzlaboratoriju validēšanas pētījums (2), kas pierādīja testa relevanci un ticamību paredzētajam nolūkam.

2. Šis tests ir skrīninga procedūra, ar ko identificē vielas, kas spēj saistīties ar *hr*ERα. To izmanto, lai noteiktu testējamās ķimikālijas spēju konkurēt ar 17β-estradiolu attiecībā uz saistīšanos ar *hr*ERα-*LBD*. Kvantitatīvie testa rezultāti var ietvert IC_{50} (mērs, kas rāda testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas vajadzīga, lai no *hr*ERα pārvietotu pusi no [^{3}H]-17β-estradiola) un testējamo ķimikāliju relatīvo afinitāti attiecībā uz *hr*ERα salīdzinājumā ar 17β-estradiolu. Ķīmiskā skrīninga vajadzībām pieņemami kvalitatīvie testa rezultāti var ietvert testējamo ķimikāliju klasificēšanu saistīgās vai nesaistīgās ar *hr*ERα vai tādās, kuru saistīgums ir neskaidrs, uz to kritēriju pamata, kas aprakstīti attiecībā uz saistīšanās līknēm.

3. Testā izmanto radioaktīvi marķētu ligandu, tāpēc laboratorijai būs vajadzīga radioaktīvo materiālu licence. Visas procedūras ar radioaktīvajiem izotopiem un bīstamām ķimikālijām jāveic, ievērojot nacionālajos tiesību aktos paredzētos noteikumus un procedūras.

4. Pirms šā testa izmantošanas regulatīviem mērķiem jāizlasa sadaļas "**VISPĀRĪGAIS IEVADS**" un "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**". Šajā testēšanas vadlīnijā izmantotās definīcijas un saīsinājumi ir aprakstīti 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPI (SK. ARĪ VISPĀRĪGO IEVADU)

5. *HrER*α saistīšanās tests mēra radioaktīvi iezīmēta liganda ([^{3}H]17β-estradiola) spēju saistīties ar ER arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas (t.i. konkurenta) koncentrāciju klātbūtnē. Testējamās ķimikālijas, kam piemīt augsta ER afinitāte, konkurē ar radioaktīvi iezīmēto ligandu pie zemākas koncentrācijas nekā ķimikālijas ar zemāku receptora afinitāti.

6. Šis tests sastāv no diviem svarīgākajiem komponentiem: piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta, kas raksturo receptora–liganda mijiedarbības parametrus, un konkurējošās saistīšanās eksperimenta, kas attiecībā uz saistīšanos ar ER raksturo konkurenci starp testējamo ķimikāliju un radioaktīvi marķēto ligandu.

▼M8

7. Piesātinājuma–saistīšanās eksperimenta mērķis ir raksturot konkrētas receptoru partijas afinitāti un konkurējošās saistīšanās eksperimentā — to skaitu preparātā. Piesātinājuma–saistīšanās eksperiments līdzsvara apstākļos mēra fiksētas estrogēnreceptora koncentrācijas afinitāti tā dabīgajam ligandam (to izsaka disociācijas konstante, *Kd*) un aktīvo receptoru domēnu koncentrāciju (*Bmax*).

8. Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra tādas vielas afinitāti, kura attiecībā uz saistīšanos ar ER konkurē ar [^{3}H]17β-estradiolu. Afinitāti kvantitatīvi izsaka kā testējamās ķimikālijas koncentrāciju, kas līdzsvara apstākļos inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās (apzīmē kā "50 % inhibējošo koncentrāciju" vai IC_{50}). To var izvērtēt arī, izmantojot relatīvo afinitāti (*RBA*, relatīvā salīdzinājumā ar estradiola IC_{50}, ko atsevišķi mēra tajā pašā izpildes reizē). Konkurējošās saistīšanās eksperiments mēra fiksētas koncentrācijas [^{3}H]17β-estradiola spēju saistīties ar ER plaša testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazona (astoņas intensitātes pakāpes) klātbūtnē. Pēc tam, ja iespējams, datus pārveido Hilla vienādojuma (A. Hills, 1910) formā, kas apraksta radioaktīvi marķētā liganda pārvietošanu, ko izraisa viena domēna konkurējošais saisteklis. Radioaktīvi marķētā estradiola pārvietošanas pakāpe līdzsvara apstākļos tiek izmantota, lai testējamo ķimikāliju raksturotu kā saistīgu, nesaistīgu vai tādu, kam ir neskaidra reakcija.

PROCEDŪRA

Pieņemamas *hr*ERα proteīna veiktspējas pierādīšana

9. Pirms piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās testu ieviešanas laboratorijas ikdienas praksē attiecībā uz katru jaunu *hr*ERα partiju ir jāpierāda to veiktspējas pareizība laboratorijā, kurā to izmantos. Veiktspēju pierāda ar divu etapu procedūru. Proti,

— veic [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās piesātinājuma testu, lai pierādītu *hr*ERα specifiskumu un piesātinājumu. Ar iegūto datu nelineāras regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1995; *Motulsky*, 1995) un no tiem izveidotu Skačārda diagrammu dokumentē *hr*ERα spēju saistīt [^{3}H]-17β-estradiolu (*Kd*) un katras partijas receptoru skaitu (*Bmax*);

— veic konkurējošās saistīšanas testu, izmantojot kontroles vielas (references estrogēnu (17β-estradiolu), vāji saistīgu vielu (piem., noretinodrelu vai noretindronu) un nesaistīgu vielu (oktiltrietoksisilānu, apzīmē ar "OTES"). Katra laboratorija izveido un uztur vēsturisku datubāzi, kurā dokumentē IC_{50} konsekventumu un citas būtiskas references estrogēna un vāja saistekļa vērtības, kas iegūtas dažādos eksperimentos un ar atšķirīgām *hr*ERα partijām. Turklāt ar kontroles vielām iegūto konkurējošās saistīšanās līkņu parametriem jābūt 95 % ticamības intervāla robežās (sk. 1. tabulu); tas izstrādāts, izmantojot to laboratoriju datus, kuras piedalījās šā testa validēšanas pētījumā (2).

1. tabula

References estrogēna un vāja saistekļa veiktspējas kritēriji, kas izstrādāti *CERI hr*ER saistīšanās testam.

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
17β-estradiols	Augšējais	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Apakšējais	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Viela	Parametrs	Vidējā vērtība [a]	Standartnovirze (n)	95 % ticamības intervāli [b]	
				apakšējā robeža	augšējā robeža
	Hilla virziena koeficients	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodrels	Augšējais	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Apakšējais	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hilla virziena koeficients	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindrons [c]	Augšējais	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Apakšējais	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hilla virziena koeficients	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

[a] Vidējā vērtība ± standartnovirze (SN) (n) lieluma paraugam kontroles testu izpildes reizēm, ko validēšanas pētījuma gaitā veica četras laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem) (sk. 2. atsauces N pielikumu).

[b] 95 % ticamības intervāli sniegti kā paraugs pieņemamības kritērijiem.

[c] Validēšanas pētījuma 4. apakšuzdevumā noretindrona testēšana nebija obligāta (sk. 2. atsauci, sk. 4. apakšuzdevumu). Tādējādi vidējā vērtība ± SN (n) kontroles testu izpildes reizēm, ko īstenoja divas laboratorijas, tika aprēķināta, izmantojot līknei atbilstošo parametru aplēses (Hilla vienādojumu ar četriem parametriem).
IC_{50} diapazons būs atkarīgs no receptoru preparāta *Kd* un katrā konkrētajā laboratorijā izmantotās radioaktīvi marķētā liganda koncentrācijas. Ir pieņemama IC_{50} diapazona atbilstoša pielāgošana, ņemot vērā to, kādos apstākļos tests ir veikts.

Laboratorijas kvalifikācijas pierādīšana

10. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "***Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI**" 17. un 18. punktu un 2. tabulu. Katrā (piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās) testā īsteno trīs neatkarīgas testa izpildes reizes (t. i., ar jauniem receptora atšķaidījumiem, ķimikālijām un reaģentiem), tās veic dažādās dienās un katrā izpildes reizē izmanto trīs replikātus.

Receptora (*hr*ERα) koncentrācijas noteikšana

11. Aktīvā receptora koncentrācija katrā atsevišķā partijā un atkarībā no uzglabāšanas apstākļiem var būt nedaudz atšķirīga. Tāpēc ir jānosaka no piegādātāja saņemtā aktīvā receptora koncentrācija. Tas ļaus panākt atbilstošu aktīvā receptora koncentrāciju testa veikšanas laikā.

12. Apstākļos, kas atbilst konkurējošās saistīšanās apstākļiem (proti, ar 0,5 nM [^{3}H]-estradiola), nominālas receptora koncentrācijas — 0,1, 0,2, 0,4 un 0,6 nM — inkubē bez estradiola (kopējā saistīšanās) un ar 1 μM nemarķēta estradiola (nespecifiskā saistīšanās). Grafiski attēlo sakarību starp specifisko saistīšanos (starpību starp kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos) un

▼M8

receptora nominālo koncentrāciju. Receptora koncentrācija, pie kuras iegūst tādas specifiskās saistīšanās vērtības, kas atbilst 40 % pievienotā radioaktīvā marķējuma, ļauj noteikt atbilstošo receptora koncentrāciju, kuru attiecīgi izmanto piesātinājuma un konkurējošās saistīšanās eksperimentiem. Samērā bieži galīgā *hr*ER koncentrācija, kas atbilst šim nosacījumam, ir 0,2 nM.

13. Ja pēc atkārtotiem mēģinājumiem neizdodas sasniegt 40 % kritēriju, eksperimenta uzstādījumus pārbauda attiecībā uz iespējamām kļūdām. Nespēja sasniegt 40 % kritēriju var norādīt, ka rekombinantajā partijā ir ļoti maz aktīvā receptora; šādos gadījumos jāapsver iespēja izmantot citu receptora partiju.

Piesātinājuma tests

14. [^{3}H]17β-estradiola astoņu augoša stipruma koncentrāciju triplikātus vērtē, pie šādiem trim turpmāk uzskaitītajiem nosacījumiem (sk. 2. tabulu):

a. testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un ER klātbūtnē. Šādi, mērot radioaktivitāti iedobēs, kurās ir tikai [^{3}H]17β-estradiols, nosaka kopējo saistīšanos;

b. testu veic ar nemarķēta 17β-estradiola koncentrāciju, kas 2000 reižu pārsniedz marķētā 17β-estradiola koncentrāciju, un ER klātbūtnē. Šāda nosacījuma mērķis ir piesātināt aktīvos saistīšanās domēnus ar nemarķētu 17β-estradiolu un, mērot radioaktivitāti iedobēs, noteikt nespecifisko saistīšanos. Visu pārējo karsto estradiolu, kas spēj saistīties ar receptoru, uzskata par nespecifiskā domēnā saistīgu, jo aukstajam estradiolam jābūt tik lielā koncentrācijā, ka tas saistās ar visiem uz receptora pieejamajiem specifiskajiem domēniem;

c. testu veic bez nemarķēta 17β-estradiola un bez ER (kopējās radioaktivitātes noteikšana).

[^{3}H]-17β-estradiola un nemarķēta 17β-estradiola šķīdumu un hrERα sagatavošana

15. Lai sagatavotu 40 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma, ņem 1 μM izejšķīduma — [^{3}H]-17β-estradiola šķīdums dimetilsulfoksīdā (DMSO) —, kam pievieno DMSO (iegūstot 200 nM) un pēc tam testa buferšķīdumu istabas temperatūrā (iegūstot 40 nM). No šiem 40 nM šķīduma, izmantojot testa buferšķīdumu istabas temperatūrā, sagatavo virkni [^{3}H]-17β-estradiola atšķaidījumu koncentrācijās no 0,313 nM līdz 40 nM (sk. paraugu 2. tabulas 12. ailē). Galīgā testa koncentrācijas diapazonā no 0,0313 līdz 4,0 nM iegūst, 10 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs (sk. 2. un 3. tabulu). Testa buferšķīduma sagatavošana un [^{3}H]-17β-estradiola oriģinālā izejšķīduma aprēķināšanas metode, balstoties uz specifisko aktivitāti, kā arī atšķaidījumu sagatavošana un koncentrāciju noteikšana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).

16. Atšķaidījumus no nemarķēta 17β-estradiola šķīduma sagatavo, 1 nM 17β-estradiola izejšķīduma pievienojot testa buferšķīdumu, lai iegūtu astoņas augoša stipruma koncentrācijas, kas sākotnēji ir diapazonā no 0,625 μM līdz 80 μM. Galīgā testa koncentrācijas diapazonā 0,0625–8 μM iegūst, 10 μl šādi sagatavoto šķīdumu iepilinot attiecīgajās 96 iedobju mikrotitrēšanas plates iedobēs, kurās paredzēts mērīt nespecifisko saistīšanos (sk. 2. un 3. tabulu). Nemarķēta 17β-estradiola atšķaidījumu sagatavošana ir sīki izskaidrota *CERI* testa protokolā (2).

▼M8

17. Izmanto receptora koncentrāciju, pie kuras specifiskā saistīšanās ir 40±10 % (sk. 12.–13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu sagatavo ar ledusaukstu testa buferšķīdumu un tieši pirms izmantošanas, t. i., pēc tam, kad ir jau sagatavotas visas pārējās iedobes, kas paredzētas kopējās saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai un tikai karstajam ligandam paredzētās iedobes.

18. 96 iedobju mikrotitrēšanas plates sagatavo saskaņā ar 2. tabulas norādījumiem, katrai [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijai sagatavojot trīs replikātus. 3. tabulā sniegti testa protokolā paredzētie [^{3}H]-17β-estradiola, nemarķēta 17β-estradiola, buferšķīduma un receptora tilpumi.

2. tabula

Piesātinājuma–saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)*	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	TB mērīšanai			NSB mērīšanai			Tikai karstā liganda noteikšanai				Nemarķēta E2 atšķaidījumi plates 4.–6. kolonnai	[^{3}H]E2 atšķaidījumi plates 1.–9. kolonnai
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 [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

TB: kopējā saistīšanās
NSB: nespecifiskā saistīšanās
[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiols
E2: nemarķēts 17β-estradiols
(*) Šeit norādītās koncentrācijas ir galīgās koncentrācijas attiecīgajā mikrotitrēšanas plates iedobē.
(**) Nemarķēta E2 un [^{3}H]E2 atšķaidījumus var sagatavot atsevišķā mikrotirēšanas platē.

▼**M8**

3. tabula

Reaģenta tilpumi piesātinājuma testa mikrotitrēšanas platē

Ailes numurs		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Sagatavošanas soļi		TB iedobes			NSB iedobes			Tikai karstais ligands		
Komponentu tilpums minētajām reakcijas iedobēm un pievienošanas kārtība	Buferšķīdums	60 µl			50 µl			90 µl		
	nemarķēts E2 (2. tabulas 11. aile)	–			10 µl			—		
	[^{3}H]E2 (2. tabulas 12. josla)	10 µl			10 µl			10 µl		
	*hr*ERα	30 µl			30 µl			—		
Kopējais reaģenta tilpums		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubācija		**REAKCIJA PĒC 2 STUNDU INKUBĀCIJAS**						Radioaktivitātes kvantificēšana uzreiz pēc sagatavošanas. Neinkubē		
Apstrāde ar 0,4 % DCC		Jā			Jā			**Nē**		
0,4 % DCC tilpums		100 µl			100 µl			—		
Filtrēšana		Jā			Jā			Nē		
DPM MĒRĪŠANA										
Scintilācijas kokteilim pievienotais kvantificēšanas tilpums		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Ja *dpm* noteikšanai mikrotitrēšanas platēs izmanto šķidruma scintilāciju skaitīšanu (*LSC*), nav ieteicams tajā pašā testa platē, kurā mēra TB un NSB, sagatavot iedobes ar karsto ligandu vienu pašu. Iedobes tikai ar karsto ligandu sagatavo citā testa platē.

(**) Ja DCC tiek atdalīts ar centrifugēšanu, tad, lai nepieļautu kontaminēšanos ar DCC, ar *LSC* metodi mērījumus veic 50 µl supernatanta.

19. Kopējas saistīšanās un nespecifiskās saistīšanās noteikšanai paredzētās mikrotitrēšanas testa plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

Ar hrERα saistītā [^{3}H]-17β-estradiola mērīšana

20. Pēc divu stundu inkubācijas perioda ar *hr*ERα saistītais [^{3}H]-17β-estradiols ir jāatdala no [^{3}H]-17β-estradiola, iedobēm pievienojot 100 µl ledusaukstas 0,4 % DCC suspensijas. Pēc tam testa plates uz 10 minūtēm novieto uz ledus, un reakcijas maisījumu un DCC suspensiju filtrē, pārnesot uz mikrotitrēšanas plates filtra, kā rezultātā tiek atdalīts DCC. Pēc tam *LSC* mēģenēs esošajam scintilācijas šķīdumam pievieno 100 µl filtrāta, lai ar šķidruma scintilāciju skaitīšanas metodi noteiktu sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*) uz mēģeni.

▼M8

21. Ja mikrotitrēšanas plates filtrs nav pieejams, alternatīvs veids DCC atdalīšanai ir centrifugēšana. Ņem 50 µl supernatanta, kas satur ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, un izmanto to scintilāciju skaitīšanai; to dara ar īpašu piesardzību, lai nepieļautu iedobju kontamināciju, saskaroties DCC.

22. Iedobes ar karsto ligandu vienu pašu izmanto, lai noteiktu testa iedobēm pievienotā [^{3}H]-17β-estradiola sabrukumu skaitu minūtē (*dpm*). Radioaktivitāti kvantificē uzreiz pēc sagatavošanas. Šīs iedobes neinkubē un neapstrādā ar DCC suspensiju, bet to saturu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā. Ar šiem mērījumi pierāda, cik daudz [^{3}H]-17β-estradiola (izteikta *dpm*) pievienots katrā iedobju kopumā, kas demonstrē kopējo saistīšanos un nespecifisko saistīšanos.

Konkurējošās saistīšanās tests

23. Konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Katrā testa veikšanas reizē izmanto trīs paralēlus katras koncentrācijas replikātus. Papildus tam attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu izpilda trīs reizes, un tas nenotiek paralēli, bet dažādos laikos. Testu veic vienā vai vairākās 96 iedobju mikrotitrēšanas platēs.

Kontroles

24. Veicot testu, katrā eksperimentā jāiekļauj paralēlais šķīdinātājs un kontroles (t. i., references estrogēns, vājš saisteklis un nesaisteklis). Katrā testa izpildes reizē vienā platē ir jābūt atsauces estrogēna un kontroļu (t.i. vāja saistekļa un nesaistekļa) pilnai koncentrāciju līknei. Visās pārējās platēs ir jābūt: i) E2 un vāja saistekļa triplikātiem augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana, t. i., gandrīz pilnīga radioaktīvi marķētā liganda pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontroļu un nespecifiskās saistīšanās triplikātiem. Testa buferšķīduma, kontroļu, [^{3}H]-17β-estradiola, *hr*ERα un testējamo ķimikāliju šķīdumu sagatavošanas procedūras ir sīki aprakstītas *CERI* testa protokolā (2).

Šķīdinātāja kontrole

25. Šķīdinātāja kontrole rāda, vai nenotiek šķīdinātāja mijiedarbība ar testa sistēmu, kā arī mēra kopējo saistīšanos (apzīmē ar "TB" — *total binding*). Ieteicamais šķīdinātājs ir DMSO. Ja testējamās ķimikālijas visaugstākā koncentrācija dimetilsulfoksīdā nešķīst, kā alternatīvu var izmantot etanolu. Galīgajā testā DMSO koncentrācija iedobēs ir 2,05 %, un to var palielināt līdz 2,5 % gadījumos, kad testējamā ķimikālija slikti šķīst. Nevajadzētu izmantot DMSO koncentrācijās, kas pārsniedz 2,5 %, jo augstākas koncentrācijas šķīdinātājs var izraisīt interferenci uz testu. Testējamajām ķimikālijām, kas nešķīst DMSO, bet ir šķīstošas etanolā, bez interferences uz testu var izmantot ne vairāk kā 2 % etanola šķīdumu.

Buferšķīduma kontrole

26. Buferšķīduma kontrole ("BC") nedrīkst saturēt ne šķīdinātāju, ne testējamo ķimikāliju, bet tā satur visus citus testa komponentus. Buferšķīduma kontroles rezultātus salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu.

▼M8

Stiprs saisteklis (references estrogēns)

27. 17β-estradiols (*CAS* 50-28-2) ir endogēnisks ligands ar augstu afinitāti (alfa apakštipa) ER. Katram *hr*ERα konkurējošās saistīšanās testam sagatavo standarta līkni ar nemarķētu 17β-estradiolu, lai varētu novērtēt, kāda ir mainība laika gaitā, veicot testu tajā pašā laboratorijā. Sagatavo astoņus nemarķēta 17β-estradiola šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) tā, lai testa iedobēs, kuras izmantos standarta līknei, šķīdumu galīgā koncentrācija būtu ar šādiem intervāliem: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Nemarķēta 17β-estradiola (1 μM) augstākā koncentrācija kalpo kā nespecifiskās saistīšanās indikators. 4. tabulā šo koncentrāciju apzīmē ar kodu "NSB", lai gan tā ir arī standarta līknes daļa.

Vājš saisteklis

28. Lai demonstrētu katra eksperimenta jutīgumu un ļautu novērtēt, kāda ir rezultātu mainība, veicot testu laika gaitā, tajā iekļauj vāju saistekli (noretinodrelu (*CAS* 68-23-5) vai — alternatīvi — noretindronu (*CAS* 68-22-4). Sagatavo astoņus vāja saistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} un 10^{-9} M.

Nesaisteklis

29. Kā negatīvo kontroli (nesaistekli) izmanto oktiltrietoksisilānu (OTES, *CAS* 2943-75-1). Tas apstiprinās, ka tests spēs noteikt ķimikālijas, kas nesaistās ar *hr*ERα. Sagatavo astoņus nesaistekļa šķīdumus dimetilsulfoksīdā (DMSO) un testa buferšķīdumā ar šādām galīgajām koncentrācijām testa iedobēs: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Alternatīvi par nesaistekļa kontroli var izmantot di-*n*-butilftalātu (DBP, *CAS* 84-72-2), bet to testē tikai līdz koncentrācijai 10^{-4}M. Ir pierādīts, ka DBP maksimālā šķīdība testā ir 10^{-4}M.

HrERα koncentrācija

30. Izmanto receptora daudzumu, pie kura specifiskā saistīšanās ir 40±10 % (sk. 3. papildinājuma 12.-13. punktu). *Hr*ERα šķīdumu sagatavo, tieši pirms izmantošanas funkcionālo *hr*ERα atšķaidot ar ledusaukstu testa buferšķīdumu.

[^{3}H]17β-estradiols

31. [^{3}H]-17β-estradiola galīgā koncentrācija testa iedobēs ir 0,5 nM.

Testējamās ķimikālijas

32. Vispirms ir jāveic šķīdības tests, lai noteiktu katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu un identificētu piemērotu koncentrācijas diapazonu, kas tiks izmantots testa protokolā. Sākotnēji katras testējamās ķimikālijas šķīdības robežu nosaka šķīdinātājā un pēc tam apstiprina testēšanas apstākļos. Galīgā testā izmantojamā koncentrācija nepārsniedz 1 mM. Diapazona noteikšanas testēšanā ietilpst šķīdinātāja kontrole; paralēli tai testē vismaz astoņus sērijveida logaritmiskus atšķaidījumus, sākot ar augstāko pieņemamo koncentrāciju (piem., 1 mM vai zemāku, balstoties uz šķīdības robežu), un vēro, kad

▼M8

šķīdums kļūst duļķains vai rada nogulsnes (sk. arī 3.papildinājuma 35. punktu). Kad testa koncentrāciju diapazons ir noteikts, testējamo ķimikāliju testē, izmantojot astoņas diapazona noteikšanas testā identificētās log koncentrācijas ar attiecīgajiem intervāliem. Otrajā un trešajā eksperimentā izmantotās koncentrācijas pielāgo pēc vajadzības, lai labāk raksturotu koncentrācijas–atbildreakcijas līkni.

33. Testējamās ķimikālijas atšķaidījumus sagatavo atbilstošā šķīdinātājā (sk. 3.papildinājuma 25. punktu). Ja testējamās ķimikālijas augstākā koncentrācija nešķīst ne DMSO, ne etanolā un lielāka šķīdinātāja daudzuma pievienošana galīgajā testa stobriņā novestu pie pieņemamās robežas pārsniegšanas, augstāko koncentrāciju var samazināt par vienu intervālu uz leju. Šādā gadījumā sērijveida koncentrācijas var papildināt ar vienu papildkoncentrāciju amplitūdas apakšā. Visas pārējas sērijveida koncentrācijas paliek nemainīgas.

34. Pievienojot testējamās ķimikālijas šķīdumus testa iedobēs, tos rūpīgi vēro, jo pievienošanas laikā var rasties nogulsnes. Datus par tām iedobēm, kurās konstatē nogulsnes, neņem vērā, pielāgojot datus līknei, un testa pārskatā norāda izslēgšanas iemeslu.

35. Ja no citiem avotiem jau ir pieejama informācija par testējamās ķimikālijas log(IC_{50}), atšķaidījumus var būt lietderīgi ģeometriski izkārtot ciešāk ap paredzamo log(IC_{50}) (t. i., pa 0,5 log vienībām). Galīgajiem rezultātiem būtu jāatspoguļo pietiekama koncentrāciju izkliede abās log (IC_{50}) pusēs, arī līknes augšējā un apakšējā punktā, un koncentrācijām jābūt pietiekami raksturojošām attiecībā uz saistīšanās līkni.

Testa plates izkārtojums

36. Sagatavo marķētas mikrotitrēšanas plates, kurās ir pa sešiem šādiem inkubētiem replikātiem: šķīdinātāja kontrole, references estrogēns (E2) visaugstākajā koncentrācijā, kas kalpo arī par nespecifiskās saistīšanās (NSB) rādītāju, buferšķīduma kontrole, trīs inkubēti replikāti katram no šiem: astoņas nesaistīgās kontroles (oktiltrietoksisilāna) koncentrācijas, septiņas zemākās references estrogēna (E2) koncentrācijas, astoņas vāja saistekļa (noretinodrela vai noretindrona) koncentrācijas un astoņas koncentrācijas no katras testējamās ķimikālijas (TC). Mikrotitrēšanas plates izkārtojuma diagrammas paraugs pilnām references estrogēna un kontroļu koncentrāciju līknēm ir sniegts 4. tabulā. Atsevišķas mikrotitrēšanas plates izmanto testējamai ķimikālijai, un ir vajadzīgas testa plates kontroles, t. i., i) E2 un vāja saistekļa triplikāti augstā koncentrācijā (maksimāla pārvietošana) un vidējā koncentrācijā (aptuveni IC_{50}); ii) šķīdinātāja kontrole (kopējā saistīšanās) un nespecifiskā saistīšanās, no katra pa sešiem replikātiem (5. tabula). Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojuma paraugs ar trijām nezināmām testējamajām ķimikālijām ir dots 3.3. papildinājumā. Darblapā, kā arī 4. un 5. tabulā norādītās koncentrācijas attiecas uz galīgajām koncentrācijām, ko izmanto katrā testēšanas iedobē. Maksimālā E2 koncentrācija ir 1×10^{-7} M, un attiecībā uz vāju saistekli jāizmanto augstākā koncentrācija, kas 1. mikrotirēšanas platē izmantota vājam saisteklim. IC_{50} koncentrāciju nosaka laboratorija, balstoties uz savu vēsturisko kontroles datubāzi. Tiek sagaidīts, ka šī vērtība būs līdzīga validācijas pētījumos konstatētajai vērtībai (sk. 1. tabulu).

▼M8

4. tabula

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums (1) (2), pilnas atsauces estrogēnu un kontroļu koncentrāciju līknes (1. plate).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buferšķīduma kontrole un pozitīvā kontrole (E2)			Vāji pozitīva kontrole (noretinodrels)			Negatīvā kontrole (OTES)			TB un NSB		
A	Tukša iedobe (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (šķīdinātāja kontrole) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Buferšķīduma kontrole		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Tukša iedobe (karsta) (*)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

(1) zkārtojuma paraugs standarta mikrotirēšanas platei, ko izmanto katrā testa izpildes reizē.
(2) Ņemiet vērā, ka šajā mikrotirēšanas platē izmantoti atšķaidījumi, kas attiecībā uz standarta mikrotitrēšanas plati aprakstīti iepriekšējās nodaļās.
Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").
(*) Reāli tukša iedobe, netiek izmantota.
(**) Tukša iedobe, netiek izmantota inkubācijas laikā, bet to izmanto, lai apstiprinātu kopējo pievienoto radioaktivitāti.

5. tabula

Konkurējošās saistīšanās testa mikrotitrēšanas plates izkārtojums, papildu plates testējamajām ķimikālijām (TC) un plates kontrolēm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testējamā ķimikālija Nr. 1 (TC-1)			Testējamā ķimikālija Nr. 2 (TC-2)			Testējamā ķimikālija Nr. 3 (TC-3)			Kontroles		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (šķīdinātāja kontrole)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Šajā piemērā vājais saisteklis ir noretinodrels (apzīmēts "NE").

▼M8

Konkurējošās saistīšanās testa izpilde

37. Katrā testēšanas plates iedobē (izņemot iedobes, kas attiecas uz kopējo saistīšanos, un tukšās, karstās iedobes, kā parādīts 6. tabulā) iepilina 50 µl testa buferšķīduma, tad samaisa ar 10 µl attiecīgi šķīdinātāja kontroles, references estrogēna (E2), vāja saistekļa, nesaistekļa un testējamās ķimikālijas un 10 µl 5 nM [^{3}H]-17β-estradiola šķīduma. Pēc tam katrā platē pievieno 30 µl ledusauksta receptora šķīduma, un uzmanīgi samaisa. Kā pēdējo reaģentu pievieno *hr*ERα šķīdumu. Testa mikrotitrēšanas plates divas stundas inkubē istabas temperatūrā (22–28°C).

6. tabula

***Hr*ER konkurējošās saistīšanās testa komponentu tilpums mikrotitrēšanas platēs**

Sagatavošanas soļi		Visas iedobes, izņemot TB	TB iedobes	Tukšās iedobes (karstas)
Komponentu tilpums minētajām reakcijas iedobēm un pievienošanas kārtība	Testa buferšķīdums istabas temperatūrā	50 µl	60 µl	90 µl
	Nemarķēts E2, vājš saisteklis, nesaisteklis, šķīdinātājs un testējamās ķimikālijas (*)	10 µl	—	—
	[^{3}H]-17β-estradiols pietiekamā daudzumā, lai panāktu galīgo koncentrāciju 0,5 nM (t. i., 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Noteiktā *hr*ERα koncentrācija (sk. 12.–13. punktu)	30 µl	30 µl	—
Kopējais tilpums katrā testa plates iedobē		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Sagatavoti tā, lai galīgā koncentrācijā netiktu pārsniegta pieņemamā šķīdinātāja koncentrācija.

38. Saskaņā ar aprakstu 3. papildinājuma 21.–23. punktā (attiecas uz piesātinājuma–saistīšanās testu) kvantificē ar *hr*ERα saistīto [^{3}H]-17β-estradiolu, taču pirms tam, katrā iedobē pievienojot 100 µl ledusaukstas DCC suspensijas, no brīvā [^{3}H]-17β-estradiola jābūt atdalītam ar *hr*ERα saistītajam [^{3}H]-17β-estradiolam.

39. Iedobes G10–12 un H10–12 (sk. 4. tabulas aili "Tukša iedobe (karsta)") raksturo marķēta [^{3}H]-estradiola *dpm* 10 µl. 10 µl alikvotu pārnes tieši scintilācijas šķīdumā.

Pieņemamības kritēriji

Piesātinājuma–saistīšanās tests

40. Ja tiek izmantotas pieaugošas [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas, specifiskās saistīšanās līknei ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar ligandu.

41. Pieņemamības diapazons attiecībā uz specifisko saistīšanos pie 0,5 nM [^{3}H]-17β-estradiola koncentrācijas ir 30–50 % no kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējās vērtības, kas mērīta visās izpildes reizēs. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija un piesātinājuma tests jāatkārto.

▼M8

42. Datiem jābūt attēlojamiem lineāras Skačārda diagrammas veidā.

43. Nespecifiskā saistīšanās nedrīkst būt pārmērīga. Nespecifiskās saistīšanās vērtība parasti ir <35 % no kopējās saistīšanās. Tomēr minētā procentuālā attiecība dažkārt šo limitu var pārsniegt, ja testā tiek mērīts ļoti zems *dpm* pie zemākās radioaktīvi marķētā 17β-estradiola koncentrācijas.

Konkurējošās saistīšanās tests

44. Pie pieaugošām nemarķēta 17β-estradiola koncentrācijām [^{3}H]-17β-estradiolu pakāpeniski pārvieto no receptora tādā veidā, kas līdzinās viena domēna konkurējošajai saistīšanai.

45. References estrogēna (t. i., 17β-estradiola) IC_{50} vērtībai jābūt aptuveni vienādai ar [^{3}H]-17β-estradiola molāro koncentrāciju, kam pieskaitīta piesātinājuma–saistīšanās testā noteiktā diasociācijas konstante (*Kd*).

46. Visās testa izpildes reizēs kopējās specifiskās saistīšanās vērtībai pastāvīgi jābūt pieņemamības diapazonā (40 ± 10 %), pie nosacījuma, ka kopējās pievienotās radioaktivitātes vidējā mērītā koncentrācija katrā iedobē ir 0,5 nM. Ir pieļaujamas atsevišķas nelielas novirzes no minētā diapazona, tomēr, ja izpildes reizēs pastāvīgi iegūst rezultātus ārpus minētā diapazona vai ja konkrētā izpildes reizē novirze ir ļoti būtiska, ir jāpielāgo proteīnu koncentrācija.

47. Šķīdinātājs nedrīkst mainīt testa jutīgumu vai reproducējamību. Šķīdinātāja kontroles rezultātus (TB iedobes) salīdzina ar buferšķīduma kontroli, lai verificētu, ka izmantotais šķīdinātājs neietekmē testa sistēmu. Ja šķīdinātājs neietekmē testa gaitu, TB un buferšķīduma kontrolēm jābūt salīdzināmām.

48. Testējot ar koncentrācijām, kas nepārsniedz 10^{-3} M (OTES) vai 10^{-4} M (DBP), nesaisteklim nevajadzētu no *hr*ERα pārvietot vairāk nekā 25 % [^{3}H]-17β-estradiola.

49. Izmantojot *CERI hr*ER saistīšanās testa validēšanas pētījuma datus (2. atsauces N pielikums), tika izstrādāti veiktspējas kritēriji attiecībā uz references estrogēnu un diviem vājiem saistekļiem (piem., noretinodrels, noretindrons). Ir sniegti 95 % ticamības intervāli vidējām vērtībām ± SN (n), kas tika iegūtas no visiem kontroles testiem, ko izpildīja četras laboratorijas, kuras piedalījās validēšanas pētījumā. 95 % ticamības intervālus aprēķināja references estrogēna un vāju saistekļu līknes pielāgošanas parametriem (t. i., augšējam un apakšējam punktam, Hilla virziena koeficientam un log IC_{50}) un vāju saistekļu $\log_{10}$ *RBA* attiecībā pret references estrogēnu. 1. tabulā sniegti līknes pielāgošanas parametru paredzamie diapazoni, kurus var izmantot kā veiktspējas kritērijus. Praksē IC_{50} diapazons var būt nedaudz atšķirīgs atkarībā no eksperimentāli iegūtā receptora preparāta *Kd* un testā izmantotās liganda koncentrācijas.

50. Testējamo ķimikāliju līknes pielāgošanas parametriem veiktspējas kritēriji izstrādāti netika, jo pastāv pārāk plašs esošu potenciāli testējamu ķimikāliju spektrs un potenciālās afinitātes un rezultātu mainīgums (piem., pilna līkne, daļēja līkne, neatbilstība līknei). Tomēr katrā testēšanas reizē un ar katru testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus būtu jāizvērtē speciālistam. Testā jāizmanto pietiekams testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazons, lai skaidri definētu konkurējošās saistīšanās līknes augšējo punktu (t. i.,

▼M8

90–100 % saistīšanās). Rezultātu mainībai starp katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas replikātiem, kā arī starp trim neatkarīgajām izpildes reizēm jābūt saprātīgi pieļaujamās robežās un zinātniski pamatojamai. Izpildot kontroles testus attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju, mērījumiem būtu jātuvojas veiktspējas parametriem, kas paziņoti attiecībā uz šo *CERI* testu, un tiem jābūt saskanīgiem ar attiecīgās laboratorijas vēsturiskajiem kontroldatiem.

DATU ANALĪZE

Piesātinājuma–saistīšanās tests

51. Tiek mērīta gan kopējā, gan nespecifiskā saistīšanās. No šim vērtībām, nespecifisko saistīšanos atņemot no kopējās saistīšanās, tiek aprēķināta pieaugošu [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju specifiskā saistīšanās līdzsvara apstākļos. Grafikā, kurā specifisko saistīšanos attēlo attiecībā pret [^{3}H]-17β-estradiola koncentrāciju, attiecībā uz maksimālo specifisko saistīšanos ir jāsasniedz atslābuma periods, kas norāda uz *hr*ERα piesātinājumu ar [^{3}H]-17β-estradiolu. Turklāt datu analīzē būtu jākonstatē [^{3}H]-17β- estradiola saistīšanās ar vienu augstas afinitātes saistīšanās domēnu. Piesātinājuma–saistīšanās līknē attēlo nespecifisko, kopējo un specifisko saistīšanos. Šo datu turpmākai analīzei izmanto nelineārās regresijas analīzi (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995), un galīgos datus attēlo ar Skačārda diagrammu.

52. Analizējot datus, *Bmax* un *Kd* nosaka no kopējās saistīšanās datiem vien, izmantojot pieņēmumu, ka nespecifiskā saistīšanās ir lineāra, ja vien nav pamatota iemesla izmantot citu metodi. Turklāt, meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. Nosakot *Bmax* un *Kd* no piesātinājuma–saistīšanās datiem, vienmēr jāizmanto liganda noplicināšanās korekcija (piem., *Swillens* (1995) metode).

Konkurējošās saistīšanās tests

53. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

54. Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem (piem., *BioSoft*; *McPherson*, 1985; *Motulsky*, 1995). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) parasti neierobežo. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Liganda noplicināšanās korekciju neizmanto. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) aprēķina kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistekļu kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, sekojot testa veikšanas norādēm 23. papildinājuma 44.–49. punktā.

▼M8

55. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa izpildes reizes testējamās ķimikālijas ieteicams sākotnēji analizēt standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles (sk. 3. papildinājuma 54.punktu). Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras testējamās ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi.

Datu interpretācija

56. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par saistīgu ar *hr*ERα, ja saistīšanās līkne ir pielāgojama un zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 % (1. attēls).

57. Pie nosacījuma, ka ir izpildīti visi pieņemamības kritēriji, testējamo ķimikāliju uzskata par nesaistīgu ar *hr*ERα, ja:

— saistīšanās līkne ir pielāgojama un pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir lielāks par 75 % vai

— saistīšanās līkni pielāgot nevar un visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.

58. Testējamās ķimikālijas klasifikāciju uzskata par neskaidru, ja nav izpildīts neviens no iepriekšminētajiem nosacījumiem (t. i., zemākais pielāgotās atbildreakcijas līknes punkts ir robežās no 76 – 51 %).

7. tabula

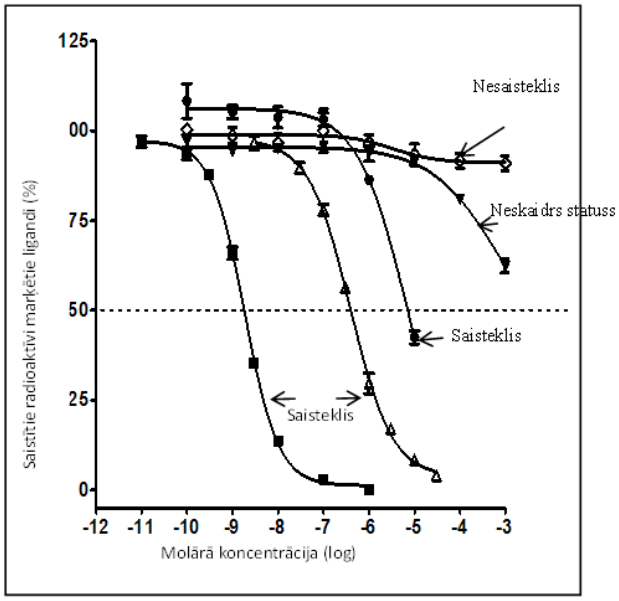
Kritēriji, pēc kuriem klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.

Klasifikācija	Kritēriji
Saisteklis[a]	Saistīšanās līkni var pielāgot. **Zemākais atbildreakcijas līknes punkts datu diapazonā ir mazāks par 50 %.**
Nesaisteklis[b]	Ja saistīšanās līkni var pielāgot, **pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts datu diapazonā ir virs 75 %.** Ja saistīšanās līkni nevar pielāgot, **visu koncentrāciju grupu vidējā zemākā nenoapaļotā procentuālā saistīšanās pēc datiem pārsniedz 75 %.**
Neskaidra[c]	Jebkura testa izpildes reize, kas neuzrāda testējamās ķimikālijas saistīgumu vai nesaistīgumu (piem., pielāgotās atbildreakcijas līknes zemākais punkts ir robežās no 76–51 %).

▼**M8**

1. attēls

Piemēri, kā klasificē testējamās ķimikālijas, izmantojot konkurējošās saistīšanās līkni.



59. Laboratorijā attiecībā uz katru testējamo ķimikāliju testu veic vairākas izpildes reizes, un katrai izpildes reizei atkarībā no rezultāta piešķir ciparisku vērtību, no kuras pēc tam aprēķina vidējo vērtību atbilstoši 8. tabulā sniegtajam paraugam. Vidējos rezultātus, kas apkopoti konkrētajā laboratorijā, salīdzina ar gaidīto katras testējamās ķimikālijas klasifikāciju.

8. tabula

Metode, pēc kuras klasificē testējamo ķimikāliju, izmantojot vairākas testēšanas reizes vienā laboratorijā.

Katrai izpildes reizei piešķir ciparisku vērtību:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	2
Neskaidrs	1
Nesaisteklis	0
Izpildes reizēs iegūto ciparisko vērtību vidējās vērtības klasificēšana:	
Klasifikācija	**Cipariska vērtība**
Saisteklis	Vidēji ≥ 1,5
Neskaidrs	0,5 ≤ Vidējā vērtība < 1,5
Nesaisteklis	Vidēji < 0,5

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

60. Sk. šīs testēšanas metodes sadaļas "*Hr*ER SAISTĪŠANĀS TESTA KOMPONENTI" 24. punktu.

▼**M8**

3.1. papildinājums

TERMINU SARAKSTS

[^{3}H]E2: 17β-estradiols, kas radioaktīvi marķēts ar tritiju.

DCC: ar dekstrānu pārklāta ogle.

E2: nemarķēts 17β-estradiols (inerts).

Testa buferšķīdums: 10 mM tris-HCl (pH 7,4), kas satur 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % glicerīna, 0,2 mM leupeptīna, 1 mM ditiotreitola un 10 mg/ml liellopu seruma albumīna.

hrERα: cilvēka rekombinantais estrogēnreceptors alfa (liganda saistīšanās domēns).

Replikāts: viena no vairākām vienāda satura un vienādas koncentrācijas iedobēm, kuras paralēli testē vienā testēšanas reizē. Pēc šī protokola katru testējamās ķimikālijas koncentrāciju testē ar trim replikātiem (triplikātiem); proti, pie katras testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir trīs replikāti, kurus testē vienlaicīgi.

Izpildes reize: viss paralēli testēto miktotitrēšanas plates testa iedobju kopums, kas nodrošina visu informāciju, kura vajadzīga, lai raksturotu testējamās ķimikālijas saistīšanos ar *hr*ERα, (t. i., kopējais testa iedobei pievienotais [^{3}H]-17β-estradiols, maksimālā [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanās ar *hr*ERα, nespecifiskā saistīšanās un kopējā saistīšanās pie dažādām testējamās ķimikālijas koncentrācijām). Izpildes reize var nozīmēt pat tikai vienas testēšanas iedobes (t. i., replikāta) testēšanu pie katras koncentrācijas, tomēr šajā konkrētajā gadījumā protokols pieprasa testēt ar triplikātiem, un viena izpildes reize nozīmē trīs testēšanas iedobes pie katras koncentrācijas. Papildus minētajam šis protokols prasa veikt trīs neatkarīgas (proti, neveicot paralēli) izpildes reizes ar katru ķimikāliju.

▼**M8**

3.2. papildinājums

KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA IEDOBJU IZKĀRTOJUMS

Plate	**Pozīcija**	**Replikāts**	**Iedobes tips**	**Iedobes kods**	**Koncentrācijas kods**	**Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)**	***hrER izejšķīdums (µl)***	**Buferšķīduma tilpums (µl)**	**Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)**	**Tilpums atšķaidījuma platē (µL)**	**Beigu tilpums (µl)**	**Konkurenta beigu koncentrācija (M)**
S	A1	1	tukša	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	tukša	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	tukša	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	auksts E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	auksts E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	auksts E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	auksts E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	auksts E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	G2	2	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	auksts E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	auksts E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrels	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrels	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrels	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrels	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrels	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	F4	1	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrels	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrels	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrels	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrels	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**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (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	OTES8DB-P7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	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	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-
S	B11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	D12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	buferšķīduma kontrole	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	buferšķīduma kontrole	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	buferšķīduma kontrole	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	buferšķīduma kontrole	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	buferšķīduma kontrole	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	buferšķīduma kontrole	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	tukša iedobe (karsta)	karsta	H1	—	90	—	10	—	100	-
S	G11 (*)	2	tukša iedobe (karsta)	karsta	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	tukša iedobe (karsta)	karsta	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	tukša iedobe (karsta)	karsta	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
S	H11 (*)	5	tukša iedobe (karsta)	karsta	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	tukša iedobe (karsta)	karsta	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	nezināms 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	nezināms 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	nezināms 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	nezināms 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	nezināms 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	nezināms 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	nezināms 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	H3	3	nezināms 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	nezināms 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	nezināms 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	nezināms 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	nezināms 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	nezināms 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	nezināms 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	nezināms 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	nezināms 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	A9	3	nezināms 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	nezināms 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	nezināms 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	nezināms 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	nezināms 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	nezināms 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	nezināms 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	nezināms 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	E2 kontrole (max)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	E2 kontrole (max)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	E2 kontrole (max)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}x10$	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	B11	2	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	E2 kontrole (IC_{50})	S	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}$x10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	NE kontrole (max)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	NE kontrole (max)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	NE kontrole (max)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	NE kontrole (IC_{50})	S	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ x10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	auksts E2 (augsta koncentrācija)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	kopējā saistīšanās	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	kopējā saistīšanās	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	kopējā saistīšanās	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Plate	Pozīcija	Replikāts	Iedobes tips	Iedobes kods	Koncentrācijas kods	Konkurenta sākotnējā koncentrācija (M)	*hrER izejšķīdums (µl)*	Buferšķīduma tilpums (µl)	Iezīmētā elementa (karsta E2) tilpums (µL)	Tilpums atšķaidījuma platē (µL)	Beigu tilpums (µl)	Konkurenta beigu koncentrācija (M)
P1	H10	4	kopējā saistīšanās	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	kopējā saistīšanās	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	kopējā saistīšanās	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) Piezīme: “karstās” iedobes inkubācijas laikā ir tukšas. 10 µl pievieno tikai scintilāciju skaitīšanai.

▼**M8**

4. papildinājums

APSVĒRUMI, KAS JĀŅEM VĒRĀ, ANALIZĒJOT *hr*ER KONKURĒJOŠĀS SAISTĪŠANĀS TESTA DATUS

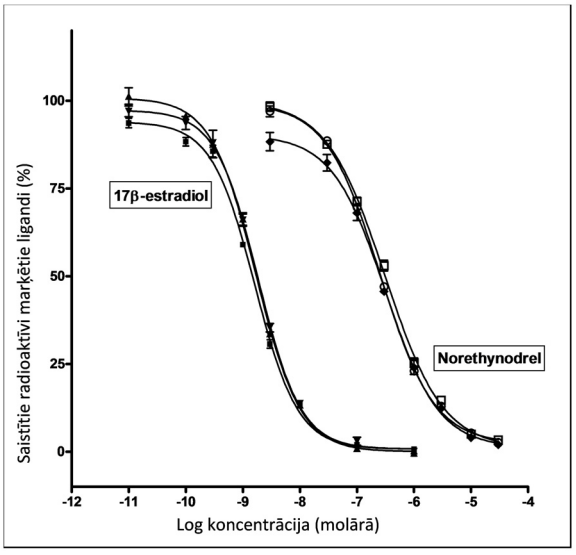
1. *Hr*ERα konkurējošās saistīšanās tests mēra vienas konkrētas [^{3}H]-17β- estradiola koncentrācijas saistīšanos arvien pieaugošu testējamās ķimikālijas koncentrāciju klātbūtnē. Konkurējošās saistīšanās līkni grafiski attēlo kā specifisko [^{3}H]-17β-estradiola saistīšanos attiecībā pret konkurenta koncentrāciju (log10 vienībās). Testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas inhibē 50 % [^{3}H]17β-estradiola maksimālās specifiskās saistīšanās, ir IC_{50} vērtība.

References estrogēna un vāja saistekļa ģenerēto datu analīze (1)

2. Kontroles testēšanas reizēs iegūtos datus transformē turpmākai analizēšanai (t. i., procentuālā [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās un kontroles ķimikālijas log koncentrācija). Pozitīvo kontroļu (t. i., references estrogēna un vāja saistekļa) log (IC_{50}) vērtību aplēses nosaka, izmantojot atbilstošu nelineāru līknes piemeklēšanas programmatūru, lai panāktu atbilstību Hilla vienādojumam ar četriem parametriem, piem., *BioSoft*; *GraphPad Prism*) (2). Veicot pielāgošanu līknei, augšējo un apakšējo punktu, virziena koeficientu un log (IC_{50}) ierobežot parasti nav vajadzīgs. Meklējot labāko atbilstību līknei, izmanto robustu regresiju, ja vien nav pamatota iemesla rīkoties citādi. Pārskatā norāda izvēlēto robustas regresijas metodi. *FW* vai *CERI hr*ER testiem liganda noplicināšanās korekcija nav vajadzīga, bet attiecīgā gadījumā var apsvērt tās lietošanu. Pēc sākotnējās analīzes katru saistīšanās līkni pārskata, lai nodrošinātu pienācīgu atbilstību paraugam. Vāja saistekļa relatīvo afinitāti (*RBA*) var aprēķināt kā procentuālu vērtību no vāja saistekļa log (IC_{50}) attiecībā pret 17β-estradiola log (IC_{50}). Ar pozitīvajām kontrolēm un nesaistīgām kontrolēm iegūtos rezultātus izvērtē, izmantojot testa veiktspējas un pieņemamības kritērijus, kas aprakstīti šajā testa metodē (20. punkts), 2.papildinājumā (*FW* testa 41.–51. punkts) un 3. papildinājumā (*CERI* tests, 41.–51. punkts). 1. attēlā sniegti references estrogēna un vāja saistekļa piemēri, testu veicot trīs reizes.

1. attēls.

Konkurējošās saistīšanās līknes piemēri ar references estrogēnu un vāja saistekļa kontroli.



▼M8

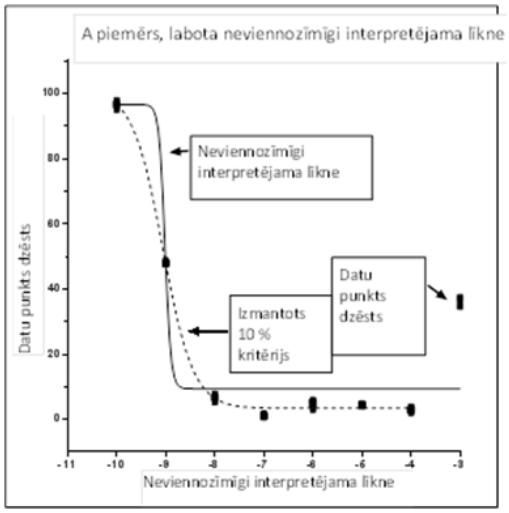
Testējamo ķimikāliju ģenerēto datu analīze

3. Datus par visam testējamajām ķimikālijām būtu jāanalizē, izmantojot pakāpenisku pieeju, kas nodrošina datu pienācīgu analīzi un to, ka katra konkurējošās saistīšanās līkne tiek klasificēta pareizi. Pirms katras testa veikšanas reizes testējamās ķimikālijas datus sākotnēji analizē standartizētā veidā, identiski tam, kā tiek analizēti references estrogēns un vāja saistekļa kontroles. Pēc tam katrā testa veikšanas reizē tehniski pārskata, vai līkne atbilst parametriem, un vizuāli nosaka, cik precīzi dati atbilst ģenerētajai konkurējošās saistīšanās līknei. Ja šīs tehniskās pārbaudes laikā novēro, ka [^{3}H]-17β-estradiola specifiskā saistīšanās atkarībā no koncentrācijas procentuāli samazinās, rezultātu mainība tehnisko replikātu starpā pie katras ķīmiskās koncentrācijas ir neliela un līknes atbilstība parametriem trīs testa veikšanas reizēs ir konsekventa, tas ir pietiekami uzticams rādītājs, ka tests un datu analīze ir veikti pareizi. Katrā testēšanas reizē attiecībā uz testējamo ķimikāliju iegūtos rezultātus ir jāizvērtē speciālistam, un datiem, pēc kuriem katru testējamo ķimikāliju klasificē kā saistīgu vai nesaistīgu, jābūt zinātniski pamatojamiem.

4. Dažkārt var būt situācijas, kad *hr*ER saistīšanās datu pienācīgas analizēšanas un interpretēšanas vajadzībām datiem ir jāveic zināmas korekcijas. Agrākos pētījumos ir novēroti gadījumi, kad receptora konkurējošās saistīšanās datu analīzi un interpretāciju apgrūtina procentuālās specifiskās saistīšanās pieaugums, ja ķimikālijas testē augstākā koncentrācijā (2. attēls). Šī problēma ir plaši zināma dažādu receptora konkurējošās saistīšanās testu protokolu lietotājiem (3). Šādos gadījumos no koncentrācijas atkarīgā atbildreakcija tiek novērota pie zemākām koncentrācijām, bet, kad testējamās ķimikālijas koncentrācija tuvojas šķīdības robežai, [^{3}H]17β-estradiola pārvietošana vairs nesamazinās. Šādos gadījumos pie augstākajām koncentrācijām iegūtie dati norāda uz to, ka ir sasniegta testa bioloģiskā robeža. Piemēram, šis fenomens daudzkārt tiek saistīts ar ķīmisko nešķīdību un izgulsnēšanos pie augstākām koncentrācijām vai arī var atspoguļot to, ka pie visaugstākajām ķīmiskajām koncentrācijām ir pārsniegta ar dekstrānu pārklātas ogles spēja atdalīšanās procedūras laikā uztvert nesaistītu radioaktīvi marķētu ligandu. Ja, veicot konkurējošās saistīšanās datu pielāgošanu divvirzienu līknei, šādus datu punktus saglabā, tas dažkārt var novest pie nepareizas ER saistīšanās potenciāla klasificēšanas attiecībā uz testējamo ķimikāliju (2. attēls). Lai no tā izvairītos, *FW* un *CERI hr*ER saistīšanās testu protokoli ietver izvēli no analīzes izslēgt tādus datu punktus, kuros ar replikātiem iegūtā [^{3}H]17β-estradiola specifiskās saistīšanās procentuālā vidējā vērtība par 10 % vai vairāk pārsniedz ar kādu zemāku koncentrāciju novēroto vidējo vērtību (to dēvē par 10 % kritēriju). Šo kritēriju attiecībā uz konkrēto līkni var izmantot tikai vienreiz, un, lai līkni varētu pareizi klasificēt, jāpaliek vēl datiem vismaz par sešām koncentrācijām.

2. attēls.

Piemēri: konkurējošās saistīšanās līknes, izmantojot 10 % kritēriju un bez tā.

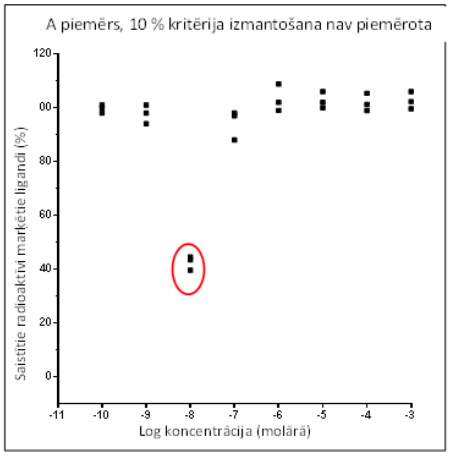


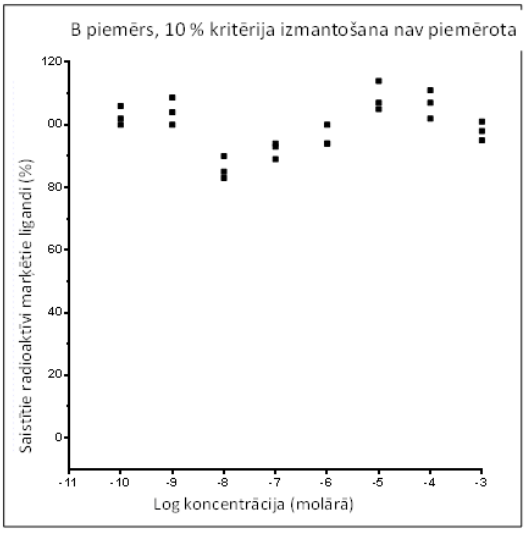
▼**M8**

5. To, vai ir atbilstoši izmantot 10 % kritēriju, lai labotu šīs līknes, ir rūpīgi jāizsver, un to izmanto vien gadījumos, kad dati stipri liecina par *hr*ER saistekli. Kad *FW hr*ER saistīšanās testa validācijas pētījuma laikā veica eksperimentus, tika novērots, ka dažkārt 10 % kritērija piemērošana izraisa neplānotas un neparedzamas sekas. Attiecībā uz ķimikālijām, kas nemijiedarbojās ar receptoru r (t. i., faktiskie nesaistekļi), pie aptuveni 100 % radioaktīvi marķēto ligandu saistīšanās bieži bija vērojama mainība, kas visā testēto koncentrāciju diapazonā pārsniedz 10 %. Ja viszemākā vērtība tika konstatēta pie zemas koncentrācijas, datus par visām augstākajām koncentrācijām potenciāli varētu izņemt no analizējamiem datiem, izmantojot 10 % kritēriju, lai gan šīs koncentrācijas var izrādīties noderīgas, nosakot, vai attiecīgā ķimikālija ir nesaisteklis. 3. attēlā sniegtie piemēri ilustrē gadījumus, kad 10 % kritērija izmantošana nav piemērota.

3. attēls.

Piemēri: konkurējošās saistīšanās dati gadījumos, kad nepiemēro 10 % kritēriju.





▼**M8**

Atsauces

(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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. www.graphpad.com/-manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. **ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJAS TESTI, KUROS APSKATĪTS ĀDAS SENSIBILIZĀCIJAS NELABVĒLĪGĀ IZNĀKUMA CEĻA (*AOP*) ATSLĒGNOTIKUMS "DENDRĪTISKO ŠŪNU AKTIVĀCIJA"**

VISPĀRĪGS IEVADS

Testēšanas metode, kuras pamatā ir atslēgnotikums "dendrītisko šūnu aktivācija"

1. Ādas sensibilizators ir viela, kas, nonākot saskarē ar ādu, izraisa alerģisku atbildreakciju, atbilstoši definīcijai, kas dota Apvienoto Nāciju Organizācijas (ANO) Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētajā sistēmā (GHS) (1) un Eiropas Savienības (ES) Regulā Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu (*CLP* regula) ([1]). Par to, kādi bioloģiskie atslēgnotikumi ir ādas sensibilizācijas pamatā, valda vispārēja vienprātība. Pašreizējās zināšanas par ķīmiskajiem un bioloģiskajiem mehānismiem, kas saistīti ar ādas sensibilizāciju, ir apkopotas, ESAO [*OECD*] *AOP* programmas ietvaros izveidojot nelabvēlīga iznākuma ceļu (*Adverse Outcome Pathway*, *AOP*) (2) no molekulārā iniciācijas notikuma un starpposma notikumiem līdz nelabvēlīgajai ietekmei, proti, alerģiskam kontaktdermatītam. Šajā gadījumā molekulārais iniciācijas notikums (proti, pirmais atslēgnotikums) ir elektrofilu vielu kovalenta saistīšanās ar nukleofilajiem centriem ādas proteīnos. Otrais atslēgnotikums šajā *AOP* notiek keratinocītos un ietver iekaisuma atbildreakcijas, kā arī izmaiņas gēnu ekspresijā, kas asociētas ar konkrētiem šūnu signālceļiem, piem., no antioksidanta/elektrofila atbildreakcijas elementa (*ARE*) atkarīgiem ceļiem. Trešais atslēgnotikums ir dendrītisko šūnu (DŠ) aktivācija, ko parasti novērtē pēc ekspresētajiem specifiskajiem šūnu virsmas marķieriem, hemokīniem un citokīniem. Ceturtais atslēgnotikums ir T šūnu aktivācija un savairošanās, ko netieši novērtē apakšdzimtas *Murinae* grauzēju limfmezglu lokālās stimulācijas testā (*LLNA*) (3).

2. Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 442E (2017). Tā apraksta *in vitro* testus, kuros apskatīti mehānismi, kas aprakstīti pie ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma (2). Šī TM ietver testus, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem saskaņā ar ANO GHS un *CLP* regulu.

Šajā TM aprakstīti šādi testi:

— cilvēka šūnu līnijas aktivācijas tests (*h-CLAT*);

— šūnu līnijas U937 aktivācijas tests (*U-SENS™*);

— interleikīna-8 reportiergēna tests (tests *IL-8 Luc*).

3. Šajā testēšanas metodē iekļautie testi no attiecīgās ESAO *TG* testiem var atšķirties ar datu ieguves procedūru un mērītajiem rādījumiem, tomēr tam, lai izpildītu valstu prasības pēc ādas sensibilizācijas *AOP* dendrītisko šūnu aktivācijas atslēgnotikuma testa rezultātiem, vienlaikus izmantojot ESAO datu savstarpējo atzīšanu, šos testus var izmantot bez izšķirības.

([1]) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakošanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353/1, 31.12.2008.).

▼M8

Atslēgnotikumā balstītajā testēšanas metodē iekļauto testu konteksts un principi

4. Līdz šim ādas sensibilizācijas novērtēšanai parasti izmantoti laboratorijas dzīvnieki. Ar klasiskām metodēm, kurās izmanto jūrascūciņas, — Magnusona–Kligmana [*Magnusson–Kligman*] maksimalizācijas testu ar jūrascūciņām (*Guinea Pig Maximisation Test*, *GPMT*) un Bīlera [*Buehler*] testu (TM B.6) (4) — tiek pētīta gan ādas sensibilizācijas inducēšanas fāze, gan tās izsaukšanas fāze. Piekrišanu ir guvuši arī apakšdzimtas *Murinae* grauzēju testi, *LLNA* (TM B.42) (3) un tā divas bezradiācijas modifikācijas, *LLNA: DA* (TM B.50) (5) un *LLNA: BrdU-ELISA* (TM B.51) (6), kuros visos tiek novērtēta vienīgi indukcijas atbildreakcija, jo šie testi dzīvnieku labklājības un objektīva ādas sensibilizācijas inducēšanas fāzes mērījuma ziņā ir pārāki par testiem ar jūrascūciņām.

5. Pēdējā laikā ķimikāliju ādas sensibilizācijas briesmu potenciāla izvērtēšanas vajadzībām pieņemtas mehānistiskas *in chemico* un *in vitro* testēšanas metodes, kurās apskatīts ādas sensibilizācijas *AOP* pirmais atslēgnotikums (TM B.59; tiešais peptīdreaģētspējas tests — *Direct Peptide Reactivity Assay* (7)) un otrais atslēgnotikums (TM B.60; ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode (8)).

6. Šajā testēšanas metodē aprakstītie testi kvantificē vai nu izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un DŠ aktivāciju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (piem., CD54, CD86), vai izmaiņas IL-8 (ar DŠ aktivāciju asociēta citokīna) ekspresijā. Ir ziņas, ka ādas sensibilizatori inducē šūnu membrānu marķieru (piem., CD40, CD54, CD80, CD83 un CD86) ekspresiju, līdztekus inducējot arī proinflamatoros citokīnus (piem., IL-1β un TNF-α) un vairākus hemokīnus, tostarp IL-8 (CXCL8) un CCL3 (9) (10) (11) (12), kas asociēti ar DŠ aktivāciju (2).

7. Tomēr, tā kā DŠ aktivācija ir tikai viens no ādas sensibilizācijas *AOP* (2) (13) atslēgnotikumiem, informācija, kas iegūta testos, kuros tiek mērīti tikai DŠ aktivācijas marķieri vien, var nebūt pietiekama, lai varētu izdarīt secinājumus par ķimikāliju ādas sensibilizācijas potenciāla esību vai neesību. Tāpēc tiek ierosināts šajā testēšanas metodē aprakstīto testu datus izmantot par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru (piem., UN GHS / *CLP* 1. kategorijas sensibilizatoru) nošķiršanā no nesensibilizatoriem integrētā testēšanas un novērtēšanas pieejā (*IATA*) kopā ar citu relevantu papildinformāciju, piem., informāciju, kas iegūta *in vitro* testos, kuros apskatīti citi ādas sensibilizācijas *AOP* atslēgnotikumi, kā arī ar metodēm, kuras neietver testēšanu un kurās pēc analoģijas principa ("aplūkot līdzīgu") tiek izmantota informācija par ķīmiskajiem analogiem (13). Ir publicēti (13) piemēri, kā šajos testos iegūtos datus var izmantot definētās pieejās, t. i., pieejās, kurās standartizēta gan izmantoto informācijas avotu kopa, gan procedūra, kādā no datiem iegūst prognozes, un tos var izmantot kā lietderīgus *IATA* elementus.

8. Šajā testēšanas metodē aprakstītos testus vienus pašus nevar izmantot ne ādas sensibilizatoru klasificēšanai ANO GHS / *CLP* apakškategorijās 1.A un 1.B (iestādēm, kuras izmanto šīs divas neobligātās apakškategorijas), ne potences prognozēšanai drošuma novērtējuma lēmumu vajadzībām. Tomēr atkarībā no tiesiskā regulējuma pozitīvus rezultātus, kas iegūti ar šīm metodēm, var izmantot ķimikālijas klasificēšanai ANO GHS / *CLP* 1. kategorijā arī vienus pašus.

▼M8

9. Terminu "testējamā ķimikālija" šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu to, kas tiek testēts ([1]), un tas nav saistīts ar testu izmantojamību vienkomponenta vielu, daudzkomponentu vielu un/vai maisījumu testēšanā. Informācija par testu izmantojamību daudzkomponentu vielu / maisījumu testēšanai pašlaik ir ierobežota (14) (15). Tomēr šie testi ir tehniski izmantojami daudzkomponentu vielu un maisījumu testēšanai. Taču, pirms šo testēšanas metodi izmantot maisījuma testēšanai nolūkā iegūt datus kādam normatīvam mērķim, jāapsver, vai un kādēļ tā varētu sniegt minētajam mērķim piemērotus rezultātus ([2]). Ja pastāv normatīva prasība maisījumu testēt, tāda apsvēršana nav vajadzīga. Turklāt, testējot daudzkomponentu vielas vai maisījumus, jāapsver iespējamā ietekme, ko uz novērotajām atbildreakcijām varētu atstāt citotoksiskie komponenti.

LITERATŪRA

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: 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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Šā pielikuma B.42. nodaļa. Limfmezglu lokālās stimulācijas tests.

(4) Šā pielikuma B.6. nodaļa. Ādas sensibilizācija.

(5) Šā pielikuma B.50. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: DA.

(6) Šā pielikuma B.51. nodaļa. Ādas sensibilizācija: limfmezglu lokālās stimulācijas tests: BrdU-ELISA.

(7) Šā pielikuma B.59. nodaļa. *In chemico* ādas sensibilizācija: tiešais peptīdreaģētspējas tests (*DPRA*).

(8) Šā pielikuma B.60. nodaļa. Ādas *in vitro* sensibilizācija: ARE-Nrf2 luciferāzes testēšanas metode.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and 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 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and 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 27:3031-8.

([1]) 2013. gada jūnijā ESAO kopīgajā sanāksmē vienojās jaunajās un atjauninātajās ESAO testēšanas vadlīnijās, kur iespējams, testa objekta apzīmēšanai konsekventāk lietot apzīmējumu "testējamā ķimikālija".

([2]) Šis teikums tika ierosināts un par to tika panākta vienošanās *WNT* 2014. gada aprīļa sanāksmē.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and 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 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: https://community.oecd.org/-community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, 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., 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. papildinājums

ĀDAS IN VITRO SENSIBILIZĀCIJA: CILVĒKA ŠŪNU LĪNIJAS AKTIVĀCIJAS TESTS (H-CLAT)

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. *h-CLAT* kvantificē izmaiņas tādu šūnu virsmas marķieru ekspresijā, kas asociēti ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86 un CD54), cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-1 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1) (2). Izmērītos CD86 un CD54 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus pēc tam izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. *h-CLAT* ir izvērtēts validācijas pētījumā, ko koordinēja Eiropas Savienības References laboratorija dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*), un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi *EURL ECVAM* Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (3) *h-CLAT* izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā *h-CLAT* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Ir pierādīts, ka *h-CLAT* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitometrisko analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 80 % gan tajā pašā laboratorijā, gan citās laboratorijās (3) (12). Validācijas pētījuma rezultāti (13) un citi publicētie pētījumi (14) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no nesensibilizatoriem ir 85 % (N=142) ar jutību 93 % (94/101) un specifiskumu 66 % (27/41) (balstoties uz *EURL ECVAM* veikto atkārtoto analīzi (12), kurā ņemti vērā visi līdzšinējie dati un neņemot vērā negatīvos rezultātus ar ķimikālijām, kuru Log K_{ow} ir lielāks par 3,5, kā aprakstīts 4. punktā). Testā *h-CLAT* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (4) (13) (15). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka metode *h-CLAT* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *h-CLAT* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka metodi *h-CLAT* var izmantot testējamām ķimikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, reakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (3) (14) (15). Metode *h-CLAT* ir izmantojama testējamajām ķimikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķimikālija nenosēžas vai no šķīdinātāja/nesēja neatdalās atsevišķās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 14. punktu). Testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, ir tendence dot pseidonegatīvus rezultātus (14). Tāpēc nevajadzētu ņemt vērā negatīvus rezultātus testos ar testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5. Tomēr pozitīvus rezultātus, kas iegūti testos ar testējamajām ķimikālijām, kuru Log K_{ow} pārsniedz 3,5, tik un tā var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķimikālijas atzīšanai par

▼M8

ādas sensibilizatoru. Turklāt izmantotās šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (16) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā *h-CLAT* var dot arī prohaptēni (t. i., vielas, kurām nepieciešama fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) un prehaptēni (t. i., vielas, kuras aktivizējas oksidējoties), jo īpaši tad, ja oksidācija norit lēni (15). Ar *h-CLAT* var vērtēt fluorescējošas testējamās ķimikālijas (17), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķimikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām vai PI tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksicitātes marķierus, ja vien, testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas (sk. 24. punktu) vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, negatīvie rezultāti jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības, ka metode *h-CLAT* nav izmantojama vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

5. Kā norādīts iepriekš, metode *h-CLAT* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Izmantojot integrētu pieeju, piem., *IATA*, tā var palīdzēt arī novērtēt sensibilizācijas potenci (4) (5) (9). Tomēr, lai noteiktu, kā *h-CLAT* rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.

6. Definīcijas ir sniegtas 1.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Metode *h-CLAT* ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķieru (piem., CD86 un CD54) ekspresijā cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līnijā THP-124 stundas pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Šīs virsmas molekulas ir tipiski THP-1 monocītu aktivācijas marķieri un var imitēt DŠ aktivāciju, kam ir izšķirīga funkcija T šūnu praimingā (aktivācijā). Izmaiņas virsmas marķieru ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas ar antivielām, kas marķētas ar fluorohromiem. Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu, lai noteiktu, vai virsmas marķieru ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai būtu vieglāk sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 26. punktu) izmanto virsmas marķieru relatīvo fluorescences intensitāti salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles fluorescences intensitāti.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 1.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 20.–22. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā laika gaitā saglabājas tāda pati.

▼M8

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *h-CLAT* dzīvniekeksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 158 (18), kas ir *EURL ECVAM* koordinētajā validācijas pētījumā izmantotais protokols. Metodi *h-CLAT* ieviešot un izmantojot laboratorijā, ieteicams lietot šo protokolu. Tālāk sniegts galveno *h-CLAT* metodes komponentu un procedūru apraksts; metodei *h-CLAT* ir divas daļas: *devas noteikšanas tests* un *CD86/CD54 ekspresijas mērījums*.

Šūnu sagatavošana

10. Metodei *h-CLAT* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1. Šūnas (TIB-202™) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.

11. THP-1 šūnas kultivē 37°C pie 5 % CO_2, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FBS*), 0,05 mM 2-merkaptoetanola, 100 vien./ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna. No penicilīna un streptomicīna izmantošanas kultūras barotnē ir iespējams izvairīties. Tomēr tādā gadījumā lietotājiem jāpārliecinās, ka antibiotiku neesība kultūras barotnē neietekmē rezultātus, piem., veicot testu ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām. Jebkurā gadījumā, lai minimalizētu kontaminācijas risku, neatkarīgi no tā, vai šūnu kultūras barotnē ir antibiotikas vai to nav, jāievēro laba šūnu kultivēšanas prakse. THP-1 šūnas parasti uzsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 0,1 līdz 0,2 × 10^6 šūnas/ml. To blīvums jāuztur diapazonā no 0,1 līdz 1,0 × 10^6 šūnas/ml. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jākvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvās kontroles, 2,4-dinitrohlorbenzolu (DNHB) (*CAS* Nr. 97-00-7, ≥ 99 % tīrība) un niķeļa sulfātu ($NiSO_4$) (*CAS* Nr. 10101-97-0, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), divas nedēļas pēc atkausēšanas. Gan DNHB, gan $NiSO_4$ būtu jāizraisa pozitīva atbildreakcija attiecībā uz abiem šūnu virsmas marķieriem — CD86 un CD54 —, un PS būtu attiecībā uz tiem abiem jāizraisa negatīva atbildreakcija. Testam izmanto tikai šūnas, kas reaģētspējas pārbaudi izturējušas. Šūnas var pavairot līdz diviem mēnešiem pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 30. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 20.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.

12. Testēšanas vajadzībām THP-1 šūnas uzsēj vai nu blīvumā 0,1 × 10^6 šūnas/ml, vai 0,2 × 10^6 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 72 vai 48 stundas. Ir svarīgi, lai šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas perioda visos eksperimentos būtu iespējami līdzīgs (izmantojot vienu vai abus iepriekš minētos priekškultivēšanas nosacījumus), jo šūnu blīvums kultivēšanas kolbā tieši pēc priekškultivēšanas var ietekmēt alergēnu inducēto CD86/CD54 ekspresiju (19). No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 2 × 10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala vai nu 24 plakandibena iedobju platē (500 µl, 1 × 10^6 šūnas uz iedobi), vai 96 plakandibena iedobju platē (80 µl, 1,6 × 10^5 šūnas uz iedobi).

Devas noteikšanas tests

13. Lai noteiktu CV_{75}, kas ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja salīdzinājumā ar to dzīvotspēju šķīdinātāja/nesēja kontrolē ir 75 %, veic *devas noteikšanas testu*. CV_{75} izmanto tam, lai noteiktu testējamo ķimikāliju koncentrāciju CD86/CD54 ekspresijas mērījumam (sk. 20.–24. punktu).

▼M8

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

14. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Izmantojot metodi *h-CLAT*, testējamās ķimikālijas izšķīdina vai stabili disperģē (sk. arī 4. punktu) fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja/nesēja variants, vai dimetilsulfoksīdā (DMSO, ≥ 99 % tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants, ja testējamā ķimikālija pirmajos divos šķīdinātājos/nesējos nešķīst vai neveido stabilu dispersiju, līdz galīgajai koncentrācijai 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO). Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķimikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātājā/nesējā.

15. Testējamo ķimikāliju izejšķīdumus, kas ir 100 mg/ml (fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē) vai 500 mg/ml (DMSO), atšķaida šādi:

— ja šķīdinātājs/nesējs ir fizioloģiskais šķīdums vai barotne: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (tā iegūstot darba šķīdumus). Ja plates augstākā galīgā koncentrācija 1 000 µg/ml nav toksiska, maksimālā koncentrācija ar jaunu citotoksiskuma testu jānosaka vēlreiz. Ja testējamā ķimikālija fizioloģiskajā šķīdumā vai barotnē izšķīdusi vai stabili disperģēta, galīgajai koncentrācijai platē nevajadzētu pārsniegt 5 000 µg/ml;

— ja šķīdinātājs/nesējs ir DMSO: sagatavo astoņus izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās), ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju izdarot sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu 2. Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 250 (tā iegūstot darba šķīdumus). Galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 1 000 µg/ml, pat ja šī koncentrācija nav toksiska.

Visbeidzot darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, THP-1 šūnu suspensijai platē pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu darba šķīduma (sk. 17. punktu), tā iegūstot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (galīgais koncentrāciju diapazons platē parasti ir 7,81–1 000 µg/ml).

16. *h-CLAT* par šķīdinātāja/nesēja kontroli izmanto kultūras barotni (testējamajām ķimikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas (sk. 4. punktu) barotnē vai fizioloģiskajā šķīdumā) vai DMSO (testējamajām ķimikālijām, kas izšķīdinātas vai stabili disperģētas DMSO), ko platē testē vienā galīgajā koncentrācijā — 0,2 %. To atšķaida tāpat, kā saskaņā ar 15. punktu atšķaida darba šķīdumus.

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 15. un 16. punktā aprakstīto kultūras barotni vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 24 plakandibena iedobju vai 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates 24±0,5 stundas inkubē 37°C temperatūrā pie 5 % CO_2. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju krusteniskās starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plati noslēdzot (20).

▼M8

Iekrāsošana ar propīdija jodīdu (PI)

18. Pēc 24±0,5 ekspozīcijas stundām šūnas pārliek paraugu stobriņos un ievāc centrifugējot. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas resuspendē 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) fosfātu fizioloģiskā buferšķīduma, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna (iekrāsošanas buferšķīdums). 200 µl šūnu suspensijas pārnes uz 96 apaļdibena iedobju plati (ja paraugi ir no 96 iedobju plates) vai mikrostobriņu (ja paraugi ir no 24 iedobju plates) un divreiz noskalo ar 200 µl (96 iedobju plates gadījumā) vai 600 µl (24 iedobju plates gadījumā) iekrāsošanas buferšķīduma. Visbeidzot šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl), kam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl; galīgā PI koncentrācija var būt, piem., 0,625 µg/ml). Citus citotoksicitātes marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD), tripānzilo v. tml., var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 1.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Citotoksiskuma mērīšana ar plūsmas citometriju un CV_{75} vērtības aplēšana

19. PI uzņemšanu analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-3. Kopā iegūst (izmēra) 10 000 dzīvu (PI-negatīvu) šūnu. Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst (izmēra) līdz 30 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$Šūnu\ dzīvotspēja = \frac{Dzīvo\ šūnu\ skaits}{Iegūto\ (izmērīto) šūnu\ kopskaits} \times 100$$

CV_{75} vērtību (sk. 13. punktu), t. i., koncentrāciju, pie kuras izdzīvo 75 % THP-1 šūnu (25 % citotokscitāte), aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

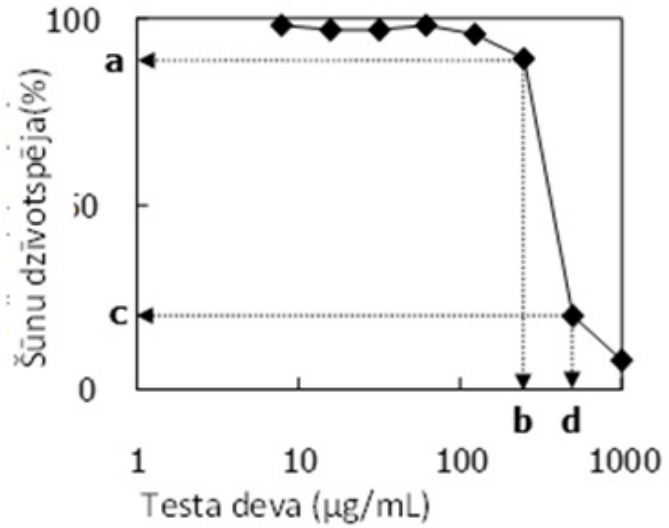
kur:

a ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 75 %;

c ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 75 %;

b un d ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi a un c.

▼**M8**



CV_{75} var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

CD86/CD54 ekspresijas mērījums

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

20. Testējamās ķimikālijas izšķīdina vai stabili disperģē piemērotā šķīdinātājā/nesējā (fizioloģiskajā šķīdumā, barotnē vai DMSO; sk. 14. punktu). Vispirms testējamās ķimikālijas atšķaida līdz koncentrācijai, kas atbilst simtkārtējai (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai piecsimtkārtējai (DMSO gadījumā) *devas noteikšanas testā* noteiktajai CV_{75} × 1,2 (sk. 19. punktu). Ja CV_{75} noteikt nav bijis iespējams (t. i., *devas noteikšanas testā* nav novērota pietiekama citotoksicitāte), par sākuma koncentrāciju izmanto augstāko koncentrāciju, kurā testējamā ķimikālija katrā šķīdinātājā/nesējā vēl šķīst vai stabili disperģējas. Jāņem vērā, ka galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5 000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1 000 µg/ml (DMSO gadījumā). Tad sērijveida atšķaidījumos ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju (atšķaidījuma koeficients 1,2) iegūst izejšķīdumus (astoņās koncentrācijās diapazonā no 100 × 1,2 × CV_{75} līdz 100 × 0,335 × CV_{75} (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai no 500 × 1,2 × CV_{75} līdz 500 × 0,335 × CV_{75} (DMSO gadījumā)), ko testēt ar metodi *h-CLAT* (dozēšanas shēmas piemēru sk. DB-ALM protokolā Nr. 158). Šos izejšķīdumus tad vēl atšķaida kultūras barotnē, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 50 (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 250 (DMSO gadījumā), un tā iegūst darba šķīdumus. Iegūtos darba šķīdumus izmanto ekspozīcijai, platē vēl veicot pēdējo atšķaidījumu ar koeficientu 2. Ja rezultāti neatbilst 29. un 30. punktā aprakstītajiem pieņemamības kritērijiem, *devas noteikšanas testu* var atkārtot, lai CV_{75} noteiktu precīzāk. Jāņem vērā, ka CD86/CD54 ekspresijas mērījumam var izmantot tikai 24 iedobju plates.

21. Šķīdinātāja/nesēja kontroli sagatavo tā, kā aprakstīts 16. punktā. Metodē *h-CLAT* par pozitīvo kontroli izmanto DNHB (sk. 11. punktu), kura izejšķīdumus sagatavo DMSO un atšķaida tā, kā izejšķīdumu sagatavošana aprakstīta 20. punktā. Par pozitīvo kontroli *CD86/CD54 ekspresijas mērījumam* platē izmanto DNHB vienā galīgajā koncentrācijā (parasti 4,0 µg/ml). Lai platē DNHB būtu koncentrācijā 4,0 µg/ml, sagatavo 2 mg/ml DNHB izejšķīdumu DMSO un tad kultūras barotnē ar koeficientu 250 atšķaida līdz 8 µg/ml darba šķīdumam. Par pozitīvās kontroles koncentrāciju var izmantot

▼M8

arī DNHB CV_{75}, ko nosaka katrā testējošajā iestādē. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzinājumus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Pozitīvajām kontrolēm galīgā koncentrācija platē nedrīkst pārsniegt 5 000 µg/ml (fizioloģiskā šķīduma vai barotnes gadījumā) vai 1 000 µg/ml (DMSO gadījumā). Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķimikālijai (sk. 29. punktu), izņemot pēdējo pieņemamības kritēriju, jo pozitīvo kontroli testē tikai vienā koncentrācijā.

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

22. Lai iegūtu prognozi, katrai testējamajai ķimikālijai un kontroles vielai ir nepieciešams viens eksperiments. Katrs eksperiments sastāv no vismaz divām neatkarīgām *CD86/CD54 ekspresijas mērījuma* izpildes reizēm (sk. 26.–28. punktu). Katru neatkarīgo izpildes reizi izdara citā dienā vai tajā pašā dienā, ja attiecībā uz katru izpildes reizi izpildīti šādi nosacījumi: a) tiek neatkarīgi sagatavoti svaigi testējamās ķimikālijas un antivielu šķīdumu izejšķīdumi un darba šķīdumi un b) tiek izmantotas neatkarīgi ievāktas šūnas (t. i., šūnas ir ievāktas no dažādām kultivēšanas kolbām); tomēr šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas, kas sagatavotas kā darba šķīdumi (500 µl), samaisa ar 500 µl suspendētu šūnu (1 x 10^6 šūnas) attiecībā 1:1 un šūnas 24±0,5 stundas inkubē, kā aprakstīts 20. un 21. punktā. Katrā izpildes reizē pietiek ar vienu katras testējamās ķimikālijas un kontroles vielas koncentrācijas replikātu, jo prognozi iegūst vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs.

Šūnu iekrāsošana un analīze

23. Pēc 24±0,5 ekspozīcijas stundām šūnas no 24 iedobju plates pārvieto uz paraugu stobriņiem, ievāc centrifugējot un tad divreiz noskalo ar 1 ml iekrāsošanas buferšķīduma (ja nepieciešams, skalošanu var vēl atkārtot). Pēc skalošanas šūnas nobloķē ar 600 µl bloķēšanas šķīduma (iekrāsošanas buferšķīdums, kas satur 0,01 % (masa/tilp.) globulīna (Kona frakcija II, III, cilvēka; SIGMA, #G2388-10G vai līdzvērtīga)) un inkubē 15 min 4°C. Pēc bloķēšanas šūnas sadala trīs 180 µl alikvotās 96 apaļdibena iedobju platē vai mikrostobriņā.

24. Pēc centrifugēšanas šūnas 30 min iekrāso 4°C, izmantojot 50 µl ar FITC marķētu anti-CD86, anti-CD54 vai peļu IgG1 (izotips) antivielu. *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstītās antivielas izmanto, tās attiecībā 3:25 (tilp./tilp.) (CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)) vai 3:50 (tilp./tilp.) (CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) un IgG1 (DAKO, #X0927)) atšķaidot ar iekrāsošanas buferšķīdumu. Pēc testa izstrādātāju atzinuma šie antivielu atšķaidījuma koeficienti nodrošina vislabāko signāla un trokšņa attiecību. Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Tomēr, lai noteiktu vispiemērotākās koncentrācijas, lietotāji var apsvērt iespēju antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Ar citiem fluorohromiem marķētas anti-CD86 un/vai

▼M8

anti-CD-54 antivielas var izmantot, ja, piem., testējot 1.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās antivielas. Jāpiezīmē, ka, mainot *h-CLAT* DB-ALM protokolā Nr. 158 (18) aprakstīto antivielu klonu vai piegādātāju, rezultāti var mainīties. Pēc vismaz divkārtējas noskalošanas ar 150 µl iekrāsošanas buferšķīduma šūnas resuspendē iekrāsošanas buferšķīdumā (piem., 400 µl) un tam pievieno PI šķīdumu (piem., 20 µl tā, lai galīgā koncentrācija būtu 0,625 µl/ml) vai cita citotoksicitātes marķiera šķīdumu (sk. 18. punktu). CD86 un CD54 ekspresijas līmeņus un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

25. CD86 un CD54 ekspresiju analizē ar plūsmas citometriju, izmantojot ieguves kanālu FL-1. Balstoties uz ģeometrisko vidējo fluorescences intensitāti (VFI), CD86 un CD54 relatīvo fluorescences intensitāti (RFI) pozitīvās kontroles (ctrl) šūnām un ar ķimikāliju apstrādātajām šūnām aprēķina ar šādu vienādojumu:

$$RFI = \frac{ar\ ķimikālijām\ apstrādāto\ šūnu\ VFI - ar\ ķimikālijām\ apstrādāto\ izotopu\ kontrolšūnu\ VFI}{ar\ šķīdin./nesēju\ apstr.\ kontrolš.\ VFI - ar\ šķīdin./nesēju\ apstr.\ izotopu\ kontrolšūnu\ VFI} \times 100$$

Ar 19. punktā norādīto vienādojumu aprēķina arī izotipa kontroles (ctrl) šūnu (šūnas, kas iekrāsotas ar peļu IgG1 (izotips) antivielām) dzīvotspēju.

Prognozes modelis

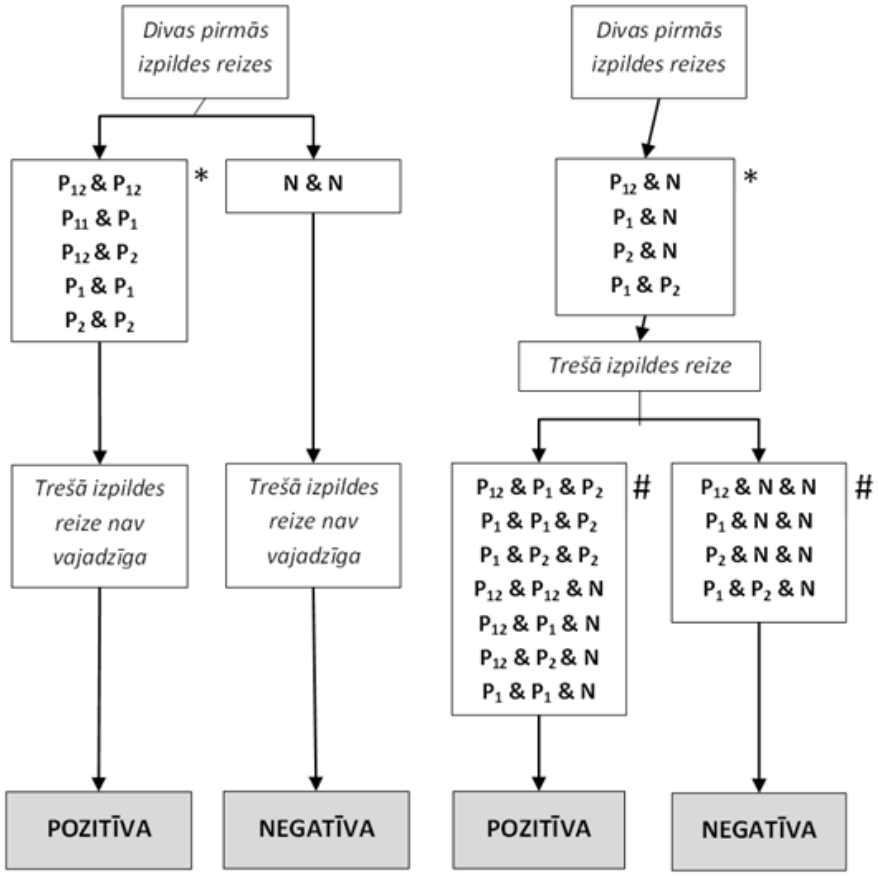
26. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), *CD86/CD54* ekspresijas mērījumam katru testējamo ķimikāliju testē vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs. Uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA, ja vismaz 2 no 2 vai vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm ir izpildīti šādi nosacījumi; pretējā gadījumā *h-CLAT* prognozi uzskata par NEGATĪVU (1. attēls):

— CD86 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 150 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %);

— CD54 RFI jebkurā testētajā koncentrācijā ir vismaz 200 % (ar šūnu dzīvotspēju ≥ 50 %).

27. Tātad, ja pirmās divas izpildes reizes abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD86 un/vai abas dod pozitīvu rezultātu attiecībā uz CD54, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Līdzīgā kārtā, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz abiem marķieriem ir negatīvas, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA (pienācīgi ņemot vērā 30. punktā noteikto) un trešā izpildes reize nav vajadzīga. Savukārt, ja pirmās divas izpildes reizes attiecībā uz vismaz vienu no marķieriem (CD54 vai CD86) nesakrīt, ir vajadzīga trešā izpildes reize, un tad galīgo prognozi nosaka pēc tā, kuru rezultātu pārsvars novērojams trīs atsevišķajās izpildes reizēs (proti, 2 no 3). Šajā aspektā jāņem vērā, ka, ja ir divas neatkarīgas izpildes reizes un viena ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86 (turpmāk "P_1") un otra ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54 (turpmāk "P_2"), ir vajadzīga trešā izpildes reize. Ja trešā izpildes reize ir negatīva attiecībā uz abiem marķieriem (turpmāk "N"), uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir NEGATĪVA. Savukārt, ja trešā izpildes reize attiecībā uz vienu no marķieriem (P_1 vai P_2) vai tiem abiem (turpmāk "P_{12}") ir pozitīva, uzskata, ka *h-CLAT* prognoze ir POZITĪVA.

▼**M8**



1. attēls. Metodē *h-CLAT* izmantotais prognozes modelis. *h-CLAT* prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem.

P_1: izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD86; P_2; izpildes reize, kas ir pozitīva tikai attiecībā uz CD54; P_{12}: izpildes reize, kas ir pozitīva gan attiecībā uz CD86, gan CD54; N: izpildes reize, kas nav pozitīva ne attiecībā uz CD86, ne CD54.

* Lodziņos redzamas relevantās pirmo divu izpildes reižu rezultātu kombinācijas neatkarīgi no tā, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

Lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti; ir vienalga, kādā kārtībā šie rezultāti iegūti.

28. Testējamajām ķimikālijām, attiecībā uz kurām ar *h-CLAT* iegūtā prognoze ir POZITĪVA, var izvēlēties noteikt divas efektīvās koncentrācijas vērtības, EC_{150} marķierim CD86 un EC_{200} marķierim CD54, t. i., koncentrācijas, kurās testējamo ķimikāliju inducētā RFI ir 150 vai 200. Izmantotas integrētā pieejā, piem., *IATA* (4) (5) (6) (7) (8), šīs efektīvās koncentrācijas vērtības var palīdzēt novērtēt sensibilizācijas potenci (9). Tās var aprēķināt ar šādiem vienādojumiem:

▼M8

$$EC150\ (CD86) = B_{konc.} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

$$EC200\ (CD86) = B_{konc.} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{konc.} - B_{konc.})]$$

kur

$A_{konc.}$ ir zemākā koncentrācija, izteikta µg/ml, kurā RFI > 150 (CD86) vai 200 (CD54);

$B_{konc.}$ ir augstākā koncentrācija, izteikta µg/ml, kurā RFI < 150 (CD86) vai 200 (CD54);

A_{RFI} ir RFI zemākajā koncentrācijā, kurā RFI > 150 (CD86) vai 200 (CD54);

B_{RFI} ir RFI augstākajā koncentrācijā, kurā RFI < 150 (CD86) vai 200 (CD54).

Lai EC_{150} un EC_{200} vērtības noteiktu precīzāk, var būt vajadzīgas trīs neatkarīgas *CD86/CD54 ekspresijas mērījuma* izpildes reizes. Galīgās EC_{150} un EC_{200} nosaka kā trīs neatkarīgo izpildes reižu efektīvo koncentrāciju mediānālo vērtību. Ja pozitivitātes kritērijiem (sk. 26.–27. punktu) atbilst tikai divas no trim neatkarīgajām izpildes reizēm, no divām aprēķinātajām vērtībām pieņem augstāko EC_{150} vai EC_{200}.

Pieņemamības kritēriji

29. Izmantojot metodi *h-CLAT*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (22) (27).

— Šūnu dzīvotspējai barotnē un šķīdinātāja/nesēja kontrolē jābūt lielākai nekā 90 %.

— Šķīdinātāja/nesēja kontrolē ne CD86, ne CD54 RFI vērtības nedrīkst pārsniegt pozitivitātes kritērijus (CD86 RFI ≥ 150 % un CD54 RFI ≥ 200 %). Šķīdinātāja/nesēja kontroles RFI vērtības aprēķina ar 25. punktā norādīto formulu ("ķimikālijas VFI" aizstājot ar "šķīdinātāja/nesēja VFI" un "šķīdinātāja/nesēja VFI" aizstājot ar "(barotnes) kontroles VFI").

— Gan barotnes, gan šķīdinātāja/nesēja kontroles CD86 un CD54 (abu divu) VFI attiecībai pret izotipa kontroles VFI jābūt > 105 %.

— Pozitīvās kontroles (DNHB) CD86 un CD54 VFI vērtībām jāatbilst pozitivitātes kritērijiem (CD86 RFI ≥ 150 un CD54 RFI ≥ 200), un šūnu dzīvotspējai jāpārsniedz 50 %.

— Testējamās ķimikālijas gadījumā šūnu dzīvotspējai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 50 % vismaz četrās testētajās koncentrācijās.

30. Negatīvi rezultāti ir pieņemami tikai attiecībā uz testējamajām ķimikālijām, kuru gadījumā šūnu dzīvotspēja augstākajā testētajā koncentrācijā (piem., 1,2 × CV_{75} saskaņā ar 20. punktā aprakstīto sērijveida atšķaidīšanas shēmu) nesasniedz 90 %. Ja šūnu dzīvotspēja koncentrācijā 1,2 × CV_{75} ir vienāda ar vai lielāka par 90 %, negatīvo rezultātu atmet. Tādā gadījumā ir ieteicams mēģināt devu izvēli vēl precizēt, CV_{75} noteikšanu atkārtojot. Jāņem vērā, ka gadījumos, kad testējamās ķimikālijas maksimālā testējamā koncentrācija ir 5 000 µg/ml fizioloģiskajā šķīdumā (vai barotnē, vai citos šķīdinātājos/nesējos), 1 000 µg/ml DMSO vai augstākā koncentrācija, kurā tā vēl šķīst, negatīvs rezultāts ir pieņemams pat tad, ja šūnu dzīvotspēja pārsniedz 90 %.

▼M8

Testēšanas pārskats

31. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, Log K_{ow}, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, Log K_{ow}, šķīdība ūdenī, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

▼**M8**

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā un ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais globulīns, antivielas un citotoksicitātes marķieris

— Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

— Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas, VFI un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un RFI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķimikālijas koncentrācijās

▼**M8**

Testa procedūra

— Izmantotais izpildes reižu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{75} (attiecīgā gadījumā), individuālās ģeometriskās VFI, RFI, šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150}/EC_{200} (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķimikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar metodi *h-CLAT* iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, 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, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Accessible at: 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, 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, 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 SN, Ramirez 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 potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, 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 PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, 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 DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, 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, 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) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: 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) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, 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, NishiyamaN, 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., 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, 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 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: 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, 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, 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. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(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. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(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, 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

1.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (21).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš):** no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (22).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV_{75}: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 75 %.

EC_{150}: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD86 ekspresijā ir 150.

EC_{200}: koncentrācijas, pie kurām RFI vērtības CD54 ekspresijā ir 200.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja):** strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Barotnes kontrole: neapstrādāts replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti. Ar šo paraugu rīkojas tāpat kā ar paraugiem, kas apstrādāti ar testējamo ķimikāliju, un citiem kontrolparaugiem, lai noteiktu, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā $\geq$ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

▼M8

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relatīvā fluorescences intensitāte (RFI): ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes (VFI) relatīvās vērtības ar ķimikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar VFI ar šķīdinātāju/nesēju apstrādātās šūnās.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (21).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (21).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 0,1 % liellopu seruma albumīna.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (21).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

▼**M8**

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (23).

***UVCB*:** vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (21).

▼**M8**

1.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *h-CLAT* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV_{75}, EC_{150} un EC_{200} vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar metodi *h-CLAT* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par metodi *h-CLAT* ir pieejami arī publicēti references dati (3) (14).

1. tabula.

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot metodi *h-CLAT*

Standartvielas	*CAS* Nr.	Agregātstāvoklis	*In vivo* prognoze (1)	CV_{75} references diapazons µg/ml (2)	*h-CLAT* rezultāts attiecībā uz CD86 (EC_{150} references diapazons µg/ml) (2)	*h-CLAT* rezultāts attiecībā uz CD54 (EC_{200} references diapazons µg/ml) (2)
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	2–12	pozitīvs (0,5–10)	pozitīvs (0,5–15)
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	5–95	pozitīvs (< 40)	negatīvs (> 1,5) (3)
niķeļa sulfāts	10101-97-0	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–500	pozitīvs (< 100)	pozitīvs (10–100)
2-merkaptobenztiazols	149-30-4	ciets	sensibilizators (vidējs)	30–400	negatīvs (> 10) (3)	pozitīvs (10–140)
R(+)-limonēns	5989-27-5	šķidrs	sensibilizators (vājš)	> 20	negatīvs (> 5) (3)	pozitīvs (< 250)
urīnvielas imidazolidinils	39236-46-9	ciets	sensibilizators (vājš)	25–100	pozitīvs (20–90)	pozitīvs (20–75)
izopropanols	67-63-0	šķidrs	nav sensibilizators	> 5 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
glicerīns	56-81-5	šķidrs	nav sensibilizators	> 5 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
pienskābe	50-21-5	šķidrs	nav sensibilizators	1 500—5 000	negatīvs (> 5 000)	negatīvs (> 5 000)
4-aminobenzoskābe	150-13-0	ciets	nav sensibilizators	> 1 000	negatīvs (> 1 000)	negatīvs (> 1 000)

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz *LLNA* datiem (3) (14). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (24).

(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (13) (25).

(3) Vēsturiski attiecībā uz šo marķieri gūti galvenokārt negatīvi rezultāti, tāpēc principā gaidāms negatīvs rezultāts. Sniegtā diapazona pamatā ir daži vēsturiski novērotie pozitīvie rezultāti. Ja tiek iegūts pozitīvs rezultāts, efektīvās koncentrācijas vērtībai jābūt ziņotajā references diapazonā.

▼**M8**

2. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: ŠŪNU LĪNIJAS U937 AKTIVĀCIJAS TESTS (*U-SENS*™)

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Tests *U-SENS*™ kvantificē izmaiņas tāda šūnu virsmas marķiera ekspresijā, kas asociēts ar monocītu un dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju (konkrētāk, CD86), cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Pēc tam izmērītos CD86 šūnu virsmas marķieru ekspresijas līmeņus šūnu līnijā U937 izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. Tests *U-SENS*™ ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko koordinēja uzņēmums *L'Oreal*, un pēc tam to neatkarīgi profesionālizvērtējusi Eiropas Savienības References laboratorijas dzīvniektestēšanas alternatīvu jomā (*EURL ECVAM*) Zinātniskā konsultatīvā komiteja (*ESAC*) (3). Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, *EURL ECVAM* ir ieteikusi (4) *U-SENS*™ izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Savā norādījumu dokumentā par ziņošanu par strukturētām pieejām datu integrācijai un individuāliem informācijas avotiem, ko izmanto ādas sensibilizācijas *IATA* ietvaros, ESAO aplūko vairākas gadījumu analīzes, kurās aprakstītas dažādas testēšanas stratēģijas un prognožu modeļi. Vienai no dažādajām definētajām pieejām pamatā ir *U-SENS* tests (5). Piemēri, kā *U-SENS*™ dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, arī vēsturiskajiem datiem un esošiem derīgiem datiem par cilvēku (6), ir pieejami arī citur literatūrā (4) (5) (7).

3. Ir pierādīts, ka tests *U-SENS*™ ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar paņēmieniem, kuros izmanto šūnu kultūras, un ar plūsmcitometrisko analīzi. Prognožu reproducējamības līmenis, kas sagaidāms no šā testa, ir aptuveni 90 % tajā pašā laboratorijā un 84 % citās laboratorijās (8). Validācijas pētījuma rezultāti (8) un citi publicētie pētījumi (1) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* rezultātiem šā testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 86 % (N=166) ar jutību 91 % (118/129) un specifiskumu 65 % (24/37). Salīdzinājumā ar rezultātiem, kas iegūti testos ar cilvēkiem, testa pareizība ādas sensibilizatoru (t. i., ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem ir 77 % (N=101) ar jutību 100 % (58/58) un specifiskumu 47 % (20/43). Salīdzinājumā ar *LLNA* testā *U-SENS*™ pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema līdz vidēja ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (t. i., ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (1) (8) (9). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *U-SENS*™ var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas var izraisīt ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *U-SENS*™ kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas novērtēšanas metodes, kurās neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

▼**M8**

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *U-SENS*™ var izmantot testējamām ķimikālijām (arī kosmētikas līdzekļu sastāvdaļām, piem., konservantiem, virsmaktīvajiem aģentiem, aktīvajiem aģentiem, krāsām), kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, fizikālķīmiskās īpašības, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un plašs tādu reakcijas mehānismu spektrs, par kuriem zināms, ka tie asociēti ar ādas sensibilizāciju (t. i., Maikla akceptora mehānisms, Šifa bāzu veidošanās, acilgrupas pārneses aģenta (acilpārneses aģenta) mehānisms, bimolekulārā nukleofilā aizvietošana [SN2] vai aromātiskā nukleofilā aizvietošana[SNAr]) (1) (8) (9) (10). Tests *U-SENS*™ ir izmantojams testējamajām ķimikālijām, kuras šķīst vai stabili disperģējas (t. i., koloīds vai suspensija, kurā testējamā ķimikālija nenosēžas vai neatdalās no šķīdinātāja/nesēja dažādās fāzēs) piemērotā šķīdinātājā/nesējā (sk. 13. punktu). Ar *U-SENS*™ izdevies iegūt pareizas prognozes attiecībā uz ķimikālijām, kas ziņotajā datu kopā norādītas kā prehaptēni (t. i., ar oksidāciju aktivētas vielas) vai prohaptēni (t. i., vielas, kam vajadzīga fermentatīva aktivācija, piem., ar P450 fermentiem) (1) (10). Sakarā ar nespecifisku CD86 ekspresijas palielinājumu pseidopozitīvus rezultātus var uzrādīt vielas, kas izraisa membrānu bojājumus, jo 3 no 7 pseidopozitīvajiem rezultātiem (salīdzinājumā ar *in vivo* references klasifikāciju) deva virsmaktīvi aģenti (1). Tātad pozitīvi rezultāti, kas iegūti, testējot virsmaktīvus aģentus, jāvērtē piesardzīgi, savukārt attiecīgus negatīvus rezultātus tomēr var izmantot par palīglīdzekli testējamās ķimikālijas atzīšanā par nesensibilizatoru. Ar *U-SENS*™ var vērtēt fluorescējošas testējamās ķimikālijas (1), tomēr ļoti fluorescējošas testējamās ķimikālijas, kuru starojuma viļņa garums ir tāds pats kā fluoresceīna izotiocianātam (FITC) vai propīdija jodīdam (PI), traucē detektēšanu ar plūsmas citometriju, tāpēc ar FITC konjugētām antivielām (potenciāli pseidonegatīvi rezultāti) vai PI (nav izmērāma dzīvotspēja) tās nevar izvērtēt pareizi. Tādā gadījumā var izmantot ar citiem fluorohromiem marķētas antivielas vai citus citotoksicitātes marķierus, ja vien, testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tie dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC marķētās antivielas vai PI (sk. 18. punktu). Ņemot vērā iepriekš minēto, pozitīvi rezultāti, kas iegūti ar virsmaktīviem aģentiem, un negatīvi rezultāti, kas iegūti ar ļoti fluorescējošām testējamajām ķimikālijām, jāinterpretē noteikto ierobežojumu kontekstā un kopā ar citiem informācijas avotiem *IATA* satvarā. Gadījumos, kad ir liecības, ka tests *U-SENS*™ nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

5. Kā norādīts iepriekš, tests *U-SENS*™ palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Integrētā pieejā, piem., *IATA*, tas var palīdzēt novērtēt arī sensibilizācijas potenci. Tomēr, lai noteiktu, kā *U-SENS*™ rezultāti varētu palīdzēt novērtēt potenci, jāiegulda papildu darbs, kura pamatā vēlams būt datiem par cilvēku.

6. Definīcijas ir sniegtas 2.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Tests *U-SENS*™ ir *in vitro* tests, kas kvantificē izmaiņas šūnu virsmas marķiera CD86 ekspresijā cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līnijā U937 45±3 stundas pēc ekspozīcijas testējamajai ķimikālijai. Virsmas marķieris CD86 ir tipisks U937 aktivācijas marķieris. Ir zināms, ka CD86 ir līdzstimulējoša molekula, kura var atdarināt monocītisko aktivāciju, kam ir svarīga nozīme T šūnu praimingā. Izmaiņas CD86 šūnu virsmas marķiera ekspresijā mēra ar plūsmas citometriju pēc šūnu iekrāsošanas, parasti ar antivielām, kas marķētas ar fluoresceīna izotiocianātu (FITC). Paralēli izdara arī citotoksiskuma mērījumu (piem., ar PI), lai noteiktu, vai CD86 šūnu virsmas

▼M8

marķiera ekspresijas aktivācija ir novērojama arī pie subcitotoksiskām koncentrācijām. Lai palīdzētu nošķirt sensibilizatorus no nesensibilizatoriem, aprēķina un prognozes modelī (sk. 19. punktu) izmanto CD86 šūnu virsmas marķiera stimulācijas indeksu (SI) salīdzinājumā ar šķīdinātāja/nesēja kontroles stimulācijas indeksu.

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

8. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (11), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 2.2. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 11. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 15.–16. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

9. Šis tests ir balstīts uz *U-SENS*™ dzīvniekeksperimentiem alternatīvu metožu datubāzes pakalpojuma (*DB-ALM*) protokolu Nr. 183 (12). Testu *U-SENS*™ ieviešot un izmantojot laboratorijā, jāizmanto darba standartprocedūras (*SOP*). Automatizētu *U-SENS*™ izpildes sistēmu var izmantot tad, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tā dod līdzīgus rezultātus. Tālāk sniegts galveno testa *U-SENS*™ komponentu un procedūru apraksts.

Šūnu sagatavošana

10. Testam *U-SENS*™ izmanto cilvēka histiocītiskās limfomas šūnu līniju U937 (13). Šūnas (klons CRL1593.2) ir ieteicams sagādāt no kvalificētas šūnu bankas, piem., Amerikas tipveida kultūru kolekcijas.

11. U937 šūnas kultivē 37 °C pie 5 % CO_2, mitrinātā atmosfērā, RPMI-1 640 barotnē, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma jeb govju fetālā seruma (*FCS*), 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 μg/ml streptomicīna (pilnīga barotne). U937 šūnas parasti pārsēj reizi 2–3 dienās blīvumā 1,5 vai 3×10^5 šūnas/ml. Šūnu blīvumam nevajadzētu pārsniegt 2×10^6 šūnas/ml, un šūnu dzīvotspējai, kas izmērīta ar tripānzilo uzņēmušo šūnu izslēgšanu, vajadzētu būt ≥ 90 % (neizmantot pirmajai pasāžai pēc atkausēšanas). Pirms izmantošanas testēšanai katra šūnu, *FCS* vai antivielu partija jākvalificē, pārbaudot tās reaģētspēju. Šūnu reaģētspēja jāpārbauda, izmantojot pozitīvo kontroli, pikrilsulfonskābi (2,4,6-trinitrobenzolsulfonskābe: TNBS) (*CAS* Nr.: 2508-19-2, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība), vismaz nedēļu pēc atkausēšanas. Pārbaudot šūnu reaģētspēju, katrai no abām kontrolēm jātestē sešas galīgās koncentrācijas (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 μg/ml un PS: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). Pilnīgā barotnē izšķīdinātai TNBS jāizsauc pozitīva koncentrācijatkarīga CD86 atbildreakcija (kurā, piem., nākamā lielākā koncentrācija aiz koncentrācijas, kas izsauc pozitīvu atbildreakciju, CD86 SI ≥ 150, dod lielāku CD86 SI), bet pilnīgā barotnē izšķīdinātai PS jāizsauc negatīva CD86 atbildreakcija (sk. 21. punktu). Testam izmanto tikai tās šūnu partijas, kas divas reizes izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Šūnas var pavairot līdz septiņām nedēļām pēc atkausēšanas. Pasāžu skaitam nevajadzētu pārsniegt 21. Reaģētspējas pārbaude veicama saskaņā ar 18.–22. punktā aprakstītajām procedūrām.

▼M8

12. Testēšanas vajadzībām U937 šūnas uzsēj vai nu blīvumā 3×10^5 šūnas/ml, vai 6×10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 2 vai 1 dienu. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums un var pierādīt (piem., testējot 2.2. papildinājuma standartvielas), ka tas dod līdzīgus rezultātus, nupat aprakstīto priekškultivēšanas apstākļu vietā var izmantot citus. No kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas testēšanas dienā resuspendē svaigā kultūras barotnē blīvumā 5×10^5 šūnas/ml. Tad šūnas sadala 96 plakandibena iedobju platē, izmantojot 100 µl (galīgais šūnu blīvums: $0{,}5 \times 10^5$ šūnas uz iedobi).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu sagatavošana

13. Pirms testēšanas novērtē šķīdību. Šajā nolūkā testējamās ķimikālijas koncentrācijā 50 mg/ml izšķīdina vai stabili disperģē pilnīgā barotnē, kas ir pirmais šķīdinātāja variants, vai, ja testējamā ķimikālijā pilnīgās barotnes šķīdinātājā/nesējā nešķīst, dimetilsulfoksīdā (DMSO, ≥ 99 % tīrība), kas ir otrais šķīdinātāja/nesēja variants. Ja ķimikālija šķīdinātājā/nesējā šķīst, tad, lai veiktu testēšanu, testējamo ķimikāliju pilnīgā barotnē izšķīdina līdz galīgajai koncentrācijai 0,4 mg/ml. Ja ķimikālija šķīst tikai DMSO, to izšķīdina līdz koncentrācijai 50 mg/ml. Ja tam ir sniegts pietiekams zinātniskais pamatojums, var izmantot citus šķīdinātājus/nesējus. Jāņem vērā testējamās ķimikālijas stabilitāte galīgajā šķīdinātājā/nesējā.

14. Testējamās ķimikālijas un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, pirmajā izpildes reizē jātestē ķimikālijas šķīdums attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā (vai nu pilnīgā barotnē, vai 0,4 % DMSO šķīduma barotnē) 6 galīgajās koncentrācijās (1, 10, 20, 50, 100 un 200 µg/ml). Nākamajās izpildes reizēs ar attiecīgo šķīdinātāju/nesēju sagatavo vismaz 4 testējamās ķimikālijas darba šķīdumus (t. i., vismaz 4 koncentrācijas) — sākot ar 0,4 mg/ml pilnīgā barotnē vai 50 mg/ml DMSO. Beigās darba šķīdumus izmanto apstrādei, platē esošajam darba šķīdumam pievienojot tādu pašu tilpumdaudzumu U937 šūnu suspensijas (sk. 11. punktu) un tādējādi panākot vēl vienu atšķaidījumu ar atšķaidījuma koeficientu 2 (12). Koncentrācijas (vismaz 4 koncentrācijas) nākamajām izpildes reizēm izvēlas atkarībā no katras iepriekšējās izpildes reizes rezultātiem (8). Izmantojamās galīgās koncentrācijas ir 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 un 200 µg/ml. Maksimālā galīgā koncentrācija ir 200 µg/ml. Ja pie 1 µg/ml konstatē pozitīvu CD86 vērtību, tad izvērtē 0,1 µg/ml, lai noskaidrotu, kādā koncentrācijā testējamā ķimikālija neinducē CD86 atbildreakciju virs pozitīvās atbildreakcijas sliekšņa. Katrā izpildes reizē, kurā tiek novērota pozitīva CD86 atbildreakcija uz attiecīgo koncentrāciju, aprēķina EC_{150} (koncentrāciju, pie kuras ķimikālija sasniedz pozitīvās CD86 atbildreakcijas slieksni 150 %; sk. 19. punktu). Ja testējamā ķimikālija inducē pozitīvu CD86 atbildreakciju neatkarīgi no koncentrācijas, aprēķināt EC_{150} var nebūt relevanti, kā aprakstīts *U-SENS*™ DB-ALM protokolā Nr. 183 (12). Katrā izpildes reizē, ja iespējams, aprēķina CV_{70} (koncentrāciju, pie kuras ķimikālija sasniedz citotoksiskuma slieksni 70 %, sk. 19. punktu) (12). Lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu, visas koncentrācijas no izmantojamo koncentrāciju vidus jāizvēlas regulāros atstatumos diapazonā no EC_{150} (vai lielākā necitotoksiskā koncentrācija, pie kuras CD86 atbildreakcija ir negatīva) un CV_{70} (vai lielākā atļautā koncentrācija, t. i., 200 µg/ml). Vienā izpildes reizē jātestē vismaz 4 koncentrācijas, no kurām vismaz 2 jābūt tādām pašām kā iepriekšējā reizē vai reizēs, lai būtu iespējams rezultātus salīdzināt.

▼M8

15. Par šķīdinātāja/nesēja kontroli testā *U-SENS*™ izmanto pilnīgu barotni (pilnīgā barotnē izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķimikālijām) (sk. 4. punktu) vai 0,4 % DMSO šķīdumu pilnīgā barotnē (DMSO izšķīdinātām vai stabili disperģētām testējamajām ķimikālijām).

16. Par pozitīvo kontroli testā *U-SENS*™ izmanto TNBS (sk. 11. punktu), kas sagatavota pilnīgā barotnē. TNBS izmantojama par pozitīvo kontroli CD86 ekspresijas mērījumam tādā vienā galīgajā koncentrācijā platē (50 µg/ml), pie kuras šūnu dzīvotspēja ir > 70 %. Lai platē TNBS būtu koncentrācijā 50 µg/ml, sagatavo 1 M (t. i., 293 mg/ml) TNBS izejšķīdumu pilnīgā barotnē un tad, izmantojot pilnīgu barotni ar koeficientu 2 930 atšķaida līdz 100 µg/ml darba šķīdumam. Par negatīvo kontroli izmanto pienskābi (PS, *CAS* Nr. 50-21-5), kas koncentrācijā 200 µg/ml izšķīdināta pilnīgā barotnē (no 0,4 mg/ml izejšķīduma). Katrā izpildes reizē katrā platē sagatavo trīs replikātus ar neapstrādātu pilnīgas barotnes kontroli, šķīdinātāja/nesēja kontroli, negatīvo un pozitīvo kontroli (12). Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās kontroles. Izpildes reižu pieņemamības kritēriji ir tādi paši kā testējamajai ķimikālijai (sk. 12. punktu).

Testējamo ķimikāliju un kontroles vielu aplicēšana

17. 14.–16. punktā aprakstīto šķīdinātāja/nesēja kontroli vai darba šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 12. punktu). Tad apstrādātās plates 45±3 stundas inkubē 37 °C temperatūrā pie 5 % CO_2. Lai izvairītos no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un ar testējamajām ķimikālijām apstrādāto šūnu starpiedobju kontaminācijas, plates pirms inkubēšanas noslēdz ar puscaurlaidīgu membrānu (12).

Šūnu iekrāsošana

18. Pēc 45±3 ekspozīcijas stundām šūnas pārliek mikrotitrēšanas platē ar V veida iedobēm un ievāc centrifugējot. Uzskata, ka novērojama ar šķīdību saistīta interference, ja 45 ± 3 stundas pēc apstrādes (pirms šūnu iekrāsošanas) zem mikroskopa novērojami kristāli vai pilieni. Supernatantus nolej un atlikušās šūnas vienreiz noskalo ar 100 µl ledusauksta fosfātu buferšķīduma (FBS), kas satur 5 % liellopu embriju seruma (iekrāsošanas buferšķīdums). Pēc centrifugēšanas šūnas resuspendē, izmantojot 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma, un 4 °C 30 min iekrāso ar 5 µl (piem., 0,25 µl) ar FITC marķētu anti-CD86 antivielu vai peļu IgG1 (izotips) antivielu, sargājot no gaismas. Izmanto *U-SENS*™ DB-ALM protokolā Nr. 183 (12) aprakstītās antivielas (CD86: BD-PharMingen #555657, klons: Fun-1, vai Caltag/Invitrogen #MHCD8601, klons: BU63; IgG1: BD-PharMingen #555748 vai Caltag/Invitrogen #GM4992). Testa izstrādātāju pieredzē dažādu partiju antivielu fluorescences intensitāte parasti ir līdzīga. Ja tie izturējuši reaģētspējas pārbaudi, testā var izmantot citus klonus vai antivielu piegādātājus (sk. 11. punktu). Tomēr, lai noteiktu vispiemērotāko koncentrāciju, lietotāji var apsvērt iespēju

▼M8

antivielas titrēt konkrētās laboratorijas apstākļos. Citas detektēšanas sistēmas, piem., ar fluorohromiem marķētas anti-CD86 antivielas, var izmantot, ja, piem., testējot 2.2. papildinājumā norādītās standartvielas, var pierādīt, ka tās dod līdzīgus rezultātus kā ar FITC konjugētās antivielas. Šūnas divreiz noskalo ar 100 µl iekrāsošanas buferšķīduma un vienreiz ar 100 µl ledusauksta FBS un tad resuspendē ledusaukstā FBS (piem., 125 µl paraugiem, ko analizē manuāli pa stobriņam, vai 50 µl autosamplera plates gadījumā), kam pievieno PI šķīdumu (galīgā koncentrācija: 3 µl/ml). Citus citotoksicitātes marķierus, piem., 7-aminoaktinomicīnu D (7-AAD) vai tripānzilo, var izmantot tad, ja iespējams pierādīt, ka alternatīvie iekrāsotāji dod līdzīgus rezultātus kā PI, piem., veicot testus ar 2.2. papildinājumā uzskaitītajām standartvielām.

Analīze ar plūsmas citometriju jeb plūsmcitometriskā analīze

19. CD86 ekspresijas līmeni un šūnu dzīvotspēju analizē ar plūsmas citometriju. Šūnas pēc lieluma (*FSC*) un granularitātes (*SSC*) attēlo logaritmiskā punktdiagrammā, lai skaidri noteiktu pirmā vārtojuma [*gate*] R1 populāciju un izslēgtu šūnu atliekas. Mērķis ir katrai iedobei vārtojumā R1 iegūt 10 000 šūnu. Šūnas no tā paša vārtojuma R1 attēlo FL3 vai FL4/SSC punktdiagrammā. Dzīvotspējīgas šūnas nošķir ar vēl vieniem vārtiem — R2 —, ar ko atlasa to šūnu populāciju, kuru reakcija uz propīdija jodīdu ir negatīva (kanāls FL3 vai FL4). Šūnu dzīvotspēju var aprēķināt ar citometra analīzes programmu, izmantojot nākamo vienādojumu. Ja šūnu dzīvotspēja ir maza, iegūst līdz 20 000 šūnu, ieskaitot nedzīvas šūnas. Alternatīva ir datus iegūt vienas minūtes laikā pēc analīzes sākšanas.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Pēc tam izmēra, kāda procentuālā daļa šo pēc R2 vārtoto dzīvotspējīgo šūnu (vārtojuma R1 ietvaros) ir FL1-pozitīvas šūnas. CD86 ekspresiju uz šūnu virsmas analizē FL1/*SSC* punktdiagrammā, kas vārtota pēc dzīvotspējīgām šūnām (vārtojums R2).

Iedobēm ar pilnīgu barotni / IgG1 analīzes marķieri nosaka tuvu pamatpopulācijai, lai pilnīgās barotnes kontrolēs IgG1 būtu mērķzonā 0,6 līdz 0,9 %.

Krāsas interference ir ar FITC marķētā IgG1 nobīde punktdiagrammā (IgG1 FL1 ģeometriski vidējais SI ≥ 150 %).

Kontroļu šūnu (neapstrādāto šūnu vai 0,4 % DMSO šķīduma šūnu) un ar ķimikāliju apstrādāto šūnu CD86 stimulācijas indeksu (SI) aprēķina ar šādu vienādojumu:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% neapstrādāto kontroles šūnu $IgG1^{+}$: FL1-pozitīvo IgG1 šūnu procentuālā daļa, kas atlasīta ar analīzes marķieri (pieņemamais diapazons: ≥ 0,6 % un < 1,5 %, sk. 22. punktu), no dzīvotspējīgajām neapstrādātajām šūnām;

% kontroles/apstrādāto šūnu $IgG1^{+}/CD86^{+}$: FL1-pozitīvo IgG1/CD86 šūnu procentuālā daļa, kas izmērīta, nepārvietojot analīzes marķieri, no dzīvotspējīgajām kontroles/apstrādātajām šūnām.

▼**M8**

Dati Un Pārskata Sagatavošana

Datu izvērtēšana

20. Testā *U-SENS*™ aprēķina šādus parametrus: CV_{70} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras U937 šūnu dzīvotspēja ir 70 % (tātad citotoksicitāte ir 30 %), un EC_{150} vērtība, t. i., koncentrācija, pie kuras testējamās ķimikālijas inducē CD86 stimulācijas indeksu (SI) 150 % apmērā.

CV_{70} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

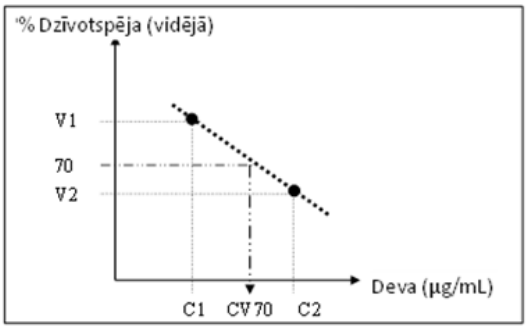
$$CV_{70} = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

kur:

V1 ir minimālā vērtība šūnu dzīvotspējai virs 70 %;

V2 ir maksimālā vērtība šūnu dzīvotspējai zem 70 %;

C1 un C2 ir koncentrācijas, pie kurām šūnu dzīvotspēja ir attiecīgi V1 un V2.



CV_{70} var noteikt arī citādi, ja vien pierāda (piem., testējot standartvielas), ka tas neietekmē rezultātus.

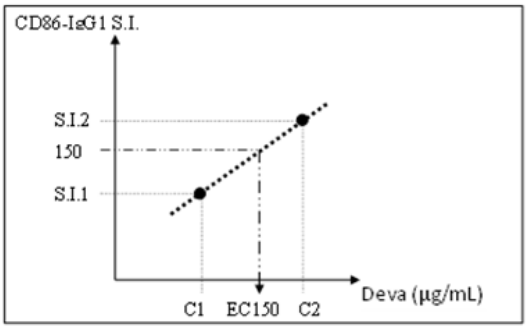
EC_{150} aprēķina ar log-lineāro interpolāciju saskaņā ar šādu vienādojumu:

$$EC_{150} = C1 + [(150 - SI1) / (SI2 - SI1) * (C2 - C1)]$$

kur:

C1 ir augstākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI < 150 % (SI1);

C2 ir zemākā koncentrācija µg/ml, pie kuras CD86 SI ≥ 150 % (SI2).



▼M8

EC_{150} un CV_{70} vērtības aprēķina šādi:

— katrā izpildes reizē EC_{150} un CV_{70} izmanto, lai noskaidrotu, kā koncentrācija ietekmē CD86 atbildreakcijas palielinājumu (sk. 14. punktu);

— balstoties uz vidējo dzīvotspēju, nosaka kopējo CV_{70} (12);

— ja ir prognozēts, ka testā *U-SENS*™ testējamās ķimikālijas rezultāts būs POZITĪVS, tad, balstoties uz CD86 vērtību vidējo SI, nosaka ķimikālijas kopējo EC_{150} (sk. 21. punktu) (12).

Prognozes modelis

21. Lai iegūtu vienu prognozi (POZITĪVU vai NEGATĪVU), *CD86* ekspresijas mērījumam katru testējamo ķimikāliju testē vismaz četrās koncentrācijās un vismaz divās neatkarīgās izpildes reizēs (dažādās dienās).

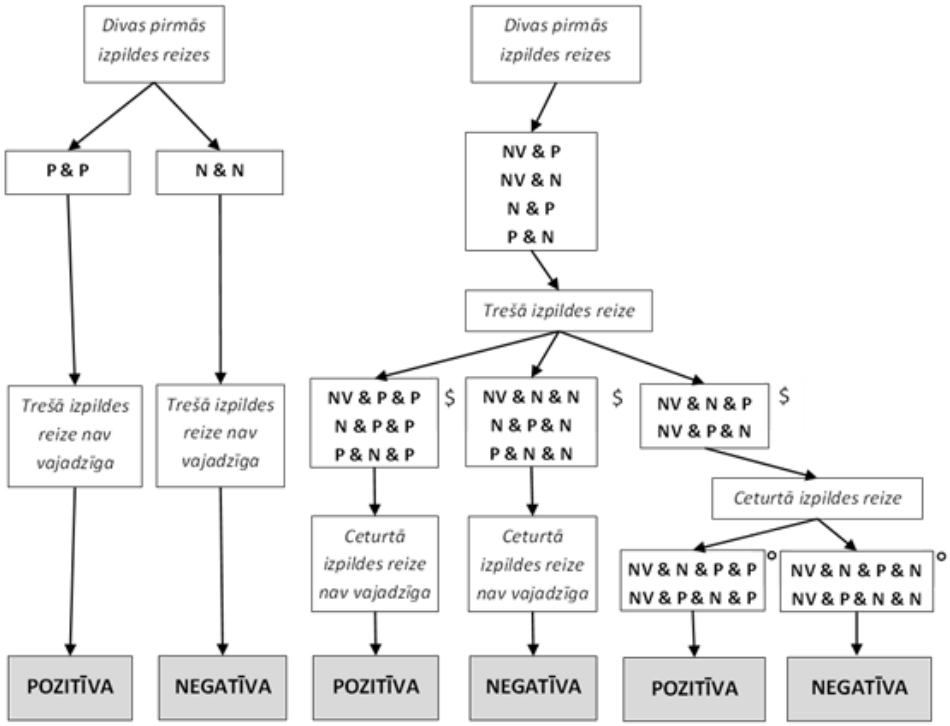
— Uzskata, ka *U-SENS*™ izpildes reizes individuālais iznākums ir negatīvs (“N”), ja CD86 SI pie visām necitotoksiskajām koncentrācijām (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %) ir mazāks par 150 % un nav novērojama nekāda interference (citotoksicitāte, šķīdība (sk. 18. punktu) vai krāsa (sk. 19. punktu), lai kādas būtu necitotoksiskās koncentrācijas, pie kurām novērota interference). Visos citos gadījumos: ja CD86 SI ir lielāks par vai vienāds ar 150 % un/vai novērota interference, uzskata, ka *U-SENS*™ izpildes reizes individuālais iznākums ir pozitīvs (“P”).

— Uzskata, ka *U-SENS*™ prognoze ir NEGATĪVA, ja negatīvas (N) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir negatīvas (N), uzskata, ka *U-SENS*™ prognoze ir NEGATĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.

— Uzskata, ka *U-SENS*™ prognoze ir POZITĪVA, ja pozitīvas (P) ir vismaz divas neatkarīgas izpildes reizes (1. attēls). Ja pirmās divas izpildes reizes abas ir pozitīvas (P), uzskata, ka *U-SENS*™ prognoze ir POZITĪVA un ka trešā izpildes reize nav vajadzīga.

— Tā kā netiek veikts devas noteikšanas tests, izņēmums ir gadījums, kad pirmajā izpildes reizē CD86 SI tikai pie augstākās necitotoksiskās koncentrācijas ir lielāks par vai vienāds ar 150 %. Tad izpildes reizi uzskata par NEVIENNOZĪMĪGU (NV) un jaunās izpildes reizēs jātestē papildu koncentrācijas (diapazonā starp augstāko necitotoksisko koncentrāciju un zemāko citotoksisko koncentrāciju; sk. 20. punktu). Ja izpildes reize ir NV, vajadzīgas vismaz 2 papildu izpildes reizes, un, ja 2. un 3. izpildes reize nedod vienādu rezultātu (neatkarīgi N un/vai P), vajadzīga vēl ceturtā izpildes reize (1. attēls). Tā kā koncentrācijas ir pielāgotas konkrētajai testējamajai ķimikālijai, papildu izpildes reizes uzskata par pozitīvām pat tad, ja CD86 sasniedz vai pārsniedz 150 % tikai vienas necitotoksiskas koncentrācijas gadījumā. Galīgā prognoze būs atkarīga no trīs vai četru atsevišķo izpildes reižu rezultātu pārsvara (t. i., 2 no 3 vai 2 no 4) (1. attēls).

▼**M8**



1. attēls. Testā *U-SENS*™ izmantojamais prognozes modelis. *U-SENS*™ prognoze jāskata *IATA* kontekstā un saskaņā ar 4. punkta un vispārīgā ievada 7., 8. un 9. punkta noteikumiem.

N: izpildes reize, kurā nav novērots ne pozitīvs CD86 rezultāts, ne interference.

P: izpildes reize, kurā novērots pozitīvs CD86 rezultāts un/vai interference.

NV: neviennozīmīgs. Pirmā izpildes reize ir neviennozīmīga vienīgi tad, ja CD86 rezultāts ir pozitīvs tikai augstākās necitotoksiskās koncentrācijas gadījumā.

#: neviennozīmīgs (NV) individuālais iznākums, kas konstatēts tikai pirmajā reizē, automātiski nozīmē, ka, lai panāktu pārsvarā pozitīvu (P) vai pārsvarā negatīvu (N) iznākumu vismaz 2 no 3 neatkarīgām izpildes reizēm, vajadzīga trešā izpildes reize.

$: lodziņos redzamas relevantās trīs izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo divu izpildes reižu rezultāti.

°: lodziņos redzamas relevantās četru izpildes reižu rezultātu kombinācijas, kuru pamatā ir iepriekšējā lodziņā norādītie pirmo trīs izpildes reižu rezultāti.

Pieņemamības kritēriji

22. Izmantojot testu *U-SENS*™, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem (12).

— 45±3 h ilgā ekspozīcijas perioda beigās neapstrādāto U937 šūnu triplikāta vidējai dzīvotspējai jābūt > 90 % un nedrīkst būt novērots CD86 ekspresijas dreifs. Neapstrādāto U937 šūnu CD86 bāzlīnijas ekspresijai jābūt diapazonā no ≥ 2 % līdz ≤ 25 %.

▼M8

— Ja par šķīdinātāju izmanto DMSO, novērtē DMSO nesēja kontroles derīgumu, aprēķinot DMSO SI salīdzinājumā ar neapstrādāto šūnu SI, un triplikāta šūnu vidējai dzīvotspējai jābūt > 90 %. DMSO nesēja kontrole ir derīga, ja tās triplikāta CD86 SI vidējā vērtība ir mazāka nekā 250 % neapstrādāto U937 šūnu triplikāta CD86 SI vidējās vērtības.

— Izpildes reizes uzskata par derīgām, ja vismaz divas no trim neapstrādāto U937 šūnu IgG1 vērtībām ir diapazonā no ≥ 0,6 % līdz < 1,5 %.

— Paralēli testēto negatīvo kontroli (pienskābe) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod negatīvu rezultātu (CD86 SI < 150 %) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %).

— Pozitīvo kontroli (TNBS) uzskata par derīgu, ja vismaz divi no trim replikātiem dod pozitīvu rezultātu (CD86 SI ≥ 150 %) un nav citotoksiski (šūnu dzīvotspēja ≥ 70 %).

Testēšanas pārskats

23. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta vielas

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība pilnīgā barotnē, šķīdība DMSO un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

▼**M8**

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība DMSO, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību testa izpildes pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā un šķīdinātāja/nesēja kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantoti citi (testēšanas vadlīnijā neminēti) šķīdinātāji/nesēji: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— Izmantotais plūsmas citometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotās antivielas un citotoksicitātes marķieris

— Procedūra, ar kādu, testējot standartvielas, pierādīta laboratorijas kompetence šā testa izpildē, un procedūra, ar kādu pierādīta šā testa rezultātu reproducējamība laika griezumā, piem., vēsturiskie kontroļu dati un/vai vēsturiskie reaģētspējas pārbaužu dati

Testa pieņemamības kritēriji

— Ar šķīdinātāja/nesēja kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un CD86 SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

▼**M8**

— Ar pozitīvo kontroli iegūtās šūnu dzīvotspējas un SI vērtības salīdzinājumā ar pieņemamības diapazoniem

— Šūnu dzīvotspēja visās testētajās testētās ķimikālijas koncentrācijās

Testa procedūra

— Izmantotais izpildes reižu skaits

— Izmantotās testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšana un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētā)

— Ekspozīcijas ilgums

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— Tabulā apkopoti dati, tostarp CV_{70} (attiecīgā gadījumā), šūnu dzīvotspējas vērtības, EC_{150} vērtības (attiecīgā gadījumā), kas katrā izpildes reizē iegūtas attiecībā uz testējamo ķimikāliju un pozitīvo kontroli, un norāde uz testējamās ķimikālijas novērtējumu saskaņā ar prognozes modeli

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar testu *U-SENS*™ iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājumi

LITERATŪRA

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., 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) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL 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. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Available at: 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 & Assessment No 256, ENV/JM/-MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [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., 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., 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., 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., 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: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Available at: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

2.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (14).

***AOP* (nelabvēlīga iznākuma ceļš):** no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (15).

Koncentrācijatkarīga CD86 atbildreakcija: ja koncentrācijai, pie kuras rezultāts ir pozitīvs (CD86 SI ≥ 150) seko koncentrācija, pie kuras CD86 SI ir vēl lielāks, ir konstatējama koncentrācijatkarība (jeb koncentrācijatkarīga atbildreakcija).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV70: aplēstā koncentrācija, pie kuras šūnu dzīvotspēja ir 70 %.

Dreifs: gadījums, kad i) 3. neapstrādātā kontroles replikāta koriģētā % $CD86^+$ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. neapstrādātā kontroles replikāta koriģēto % $CD86^+$ vērtību vidējās vērtības un ii) 3. negatīvās kontroles replikāta koriģētā % $CD86^+$ vērtība ir mazāka par 50 % no 1. un 2. negatīvās kontroles replikāta koriģēto % $CD86^+$ vērtību vidējās vērtības.

EC150: aplēstās koncentrācijas, pie kurām CD86 ekspresijas SI ir 150 %.

Plūsmas citometrija: citometrijas paņēmiens, kurā fluīdā suspendētas šūnas pa vienai laiž caur fokusētu ierosinošu gaismu, kura izkliedējas šūnām un to sastāvdaļām specifiskos rakstos; šūnas nereti tiek marķētas ar fluorescējošiem marķieriem tā, ka tās gaismu vispirms absorbē un tad emitē mainītā frekvencē.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

***IATA* (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja):** strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

▼M8

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā, piem., oksidācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (14).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (14).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

SI: stimulācijas indekss. ģeometriskās vidējās fluorescences intensitātes relatīvās vērtības ar ķimikāliju apstrādātās šūnās salīdzinājumā ar attiecīgajām vērtībām ar šķīdinātāju apstrādātās šūnās.

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (14).

Iekrāsošanas buferšķīdums: fosfātu fizioloģiskais buferšķīdums, kas satur 5 % liellopu embriju seruma.

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un nemainot tās sastāvu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testu.

▼**M8**

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (16).

***UVCB*:** vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīgs tests: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam (14).

▼**M8**

2.2. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāapliecina sava tehniskā kompetence, pareizi iegūstot paredzamo *U-SENS*™ prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 10 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 10 standartvielām iegūstot CV70 un EC150 vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Standartvielas ir atlasītas tā, lai tās reprezentētu visu ādas sensibilizācijas apdraudējumu izraisīto atbildreakciju diapazonu. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *U-SENS*™ iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *U-SENS*™ iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *U-SENS*™ ir pieejami arī publicēti references dati (1) (8).

1. tabula.

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *U-SENS*™

Standartvielas	***CAS* Nr.**	**Agregāt-stāvoklis**	***In vivo* prognoze (1)**	**U-SENS™ Šķīdinātājs/ nesējs**	**U-SENS™ CV70 references diapazons µg/ml (2)**	**U-SENS™ EC150 references diapazons µg/ml (2)**
4-fenilēndiamīns	106-50-3	ciets	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne (3)	< 30	pozitīvs (≤ 10)
pikrilsulfonskābe	2508-19-2	šķidrs	sensibilizators (spēcīgs)	pilnīga barotne	> 50	pozitīvs (≤ 50)
dietilmaleāts	141-05-9	šķidrs	sensibilizators (vidējs)	DMSO	10–100	pozitīvs (≤ 20)
rezorcīns	108-46-3	ciets	sensibilizators (vidējs)	pilnīga barotne	> 100	pozitīvs (≤ 50)
kanēļspirts	104-54-1	ciets	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (10–100)
4-alilanizols	140-67-0	šķidrs	sensibilizators (vājš)	DMSO	> 100	pozitīvs (< 200)
saharīns	81-07-2	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)
glicerīns	56-81-5	šķidrs	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
pienskābe	50-21-5	šķidrs	nav sensibilizators	pilnīga barotne	> 200	negatīvs (> 200)
salicilskābe	69-72-7	ciets	nav sensibilizators	DMSO	> 200	negatīvs (> 200)

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs

(1) *In vivo* bīstamības (un potences) prognoze ir balstīta uz *LLNA* datiem (1) (8). *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (17).

(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (8).

(3) Pilnīga barotne — barotne RPMI-1640, kas papildināta ar 10 % liellopu embriju seruma, 2 mM L-glutamīna, 100 vienībām/ml penicilīna un 100 µg/ml streptomicīna (8).

▼**M8**

3. papildinājums

ĀDAS *IN VITRO* SENSIBILIZĀCIJA: TESTS *IL-8 LUC*

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

1. Atšķirībā no testiem, ar ko analizē šūnu virsmas marķieru ekspresiju, tests *IL-8 Luc* kvantificē izmaiņas IL-8 — ar dendrītisko šūnu (DŠ) aktivāciju asociēta citokīna — ekspresijā. Izmantojot no THP-1 iegūto IL-8 reportiersšūnu līniju (THP-G8, kas izveidota no cilvēka akūtās monocītiskās leikēmijas šūnu līnijas THP-1), mēra IL-8 ekspresiju pēc ekspozīcijas sensibilizatoriem (1). Tad luciferāzes ekspresiju izmanto par palīglīdzekli ādas sensibilizatoru nošķiršanā no nesensibilizatoriem.

2. Tests *IL-8 Luc* ir izvērtēts validācijas pētījumā (2), ko veica Japānas Alternatīvo metožu validācijas centrs (*JaCVAM*), **Ekonomikas, tirdzniecības un rūpniecības ministrija** (*METI*) un **Japānas Dzīvniektestēšanas alternatīvu biedrība** (*JSAAF*), un pēc tam ar **Starptautiskās sadarbības alternatīvu testēšanas metožu jomā** (*ICATM*) atbalstu neatkarīgi profesionālizvērtēts (3) *JaCVAM* un Veselības, darba un labklājības ministrijas (*MHLW*) paspārnē. Ņemot vērā visus pieejamos pierādījumus un regulatoru un ieinteresēto personu sniegtās ziņas, testu *IL-8 Luc* ir lietderīgi izmantot *IATA* ietvaros par palīglīdzekli, kas palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no nesensibilizatoriem apdraudējumu klasificēšanas un marķēšanas vajadzībām. Piemēri, kā testa *IL-8 Luc* dati izmantoti kombinācijā ar citu informāciju, ir pieejami literatūrā (4) (5) (6).

3. Ir pierādīts, ka tests *IL-8 Luc* ir pārnesams uz laboratorijām, kam ir pieredze ar šūnu kultūrām un luciferāzes mērījumiem. Reproducējamības līmenis ir attiecīgi 87,7 % tajā pašā laboratorijā un 87,5 % citās laboratorijās (2). Validācijas pētījuma dati (2) un citi publicētie darbi (1) (6) kopumā liecina, ka salīdzinājumā ar *LLNA* testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 118 no 143 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 25 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība ādas sensibilizatoru (ANO GHS / *CLP* 1. kat.) nošķiršanā no ādas nesensibilizatoriem (ANO GHS / *CLP* nekategorizēti) ir 86 % (101/118) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 41 % (9/22). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus tālāk (5. punktā) aprakstītā izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 113 no 136 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 23 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa *IL-8 Luc* pareizība bija 89 % (101/113) ar jutību 96 % (92/96) un specifiskumu 53 % (9/17). Izmantojot *Urbisch et al.* (7) norādītos datus par cilvēku, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 76 no 90 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un attiecībā uz 14 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un pareizība bija 80 % (61/76) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 39 % (7/18). Izslēdzot vielas, kas ir ārpus izmantojamības lauka, testā *IL-8 Luc* attiecībā uz 71 no 84 ķimikālijām slēdziens bija pozitīvs vai negatīvs un

▼**M8**

attiecībā uz 13 ķimikālijām — neviennozīmīgs, un testa pareizība bija 86 % (61/71) ar jutību 93 % (54/58) un specifiskumu 54 % (7/13). Testā *IL-8 Luc* pseidonegatīvas prognozes, visticamāk, skars ķimikālijas, kurām novērojama zema/vidēja ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / *CLP* 1.B apakškategorija), nevis ķimikālijas, kurām novērojama augsta ādas sensibilizācijas potence (ANO GHS / *CLP* 1.A apakškategorija) (6). Visa šī informācija kopā norāda uz to, ka tests *IL-8 Luc* var palīdzēt identificēt apdraudējumus, kas izraisa ādas sensibilizāciju. Tomēr pareizības vērtības, kas šeit sniegtas attiecībā uz *IL-8 Luc* kā atsevišķu testu, ir tikai orientējošas, jo šis tests jāskata kombinācijā ar citiem informācijas avotiem *IATA* kontekstā un saskaņā ar vispārīgā ievada 7. un 8. punkta noteikumiem. Turklāt, izvērtējot ādas sensibilizācijas testus, kuros neizmanto dzīvniekus, jāņem vērā, ka *LLNA* tests, tāpat kā citi testi ar dzīvniekiem, var nepilnīgi atspoguļot situāciju cilvēka gadījumā.

4. Balstoties uz pašlaik pieejamajiem datiem, ir pierādīts, ka testu *IL-8 Luc* var izmantot testējamām ķimikālijām, kuru sakarā aktuālas ir dažādas organiskās funkcionālās grupas, reakcijas mehānismi, ādas sensibilizācijas potence (kas noteikta *in vivo* pētījumos) un fizikālķīmiskās īpašības (2) (6).

5. Lai gan testā *IL-8 Luc* par šķīdinātāju izmanto *X-VIVO™ 15*, tas pareizi izvērtēja ķimikālijas, kuru Log K_{ow} >3.5, un ķimikālijas, kuru šķīdība ūdenī, aprēķināta ar *EPI Suite™*, ir apmēram 100 μg/ml; sensibilizatorus, kas ūdenī šķīst vāji, tas detektē labāk nekā tests *IL-8 Luc*, kurā par šķīdinātāju izmanto dimetilsulfoksīdu (DMSO) (2). Tomēr attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas koncentrācijā 20 mg/ml neizšķīst, rezultāti sakarā ar to vājo šķīdību *X-VIVO™ 15* var būt pseidonegatīvi. Tāpēc šādu ķimikāliju gadījumā negatīvus rezultātus ņemt vērā nedrīkst. Validācijas pētījumā tika konstatēts, ka daudz pseidonegatīvu rezultātu iegūst, testējot anhidrīdus. Turklāt šūnu līnijas ierobežotās metaboliskās spējas (8) un eksperimenta apstākļu dēļ negatīvus rezultātus testā var dot arī prohaptēni (vielas, kurām nepieciešama metaboliskā aktivācija) un prehaptēni (vielas, kuras aktivizējas oksidējoties). Tomēr, lai gan domājamiem prehaptēniem/prohaptēniem (ķimikālijām, par kurām ir aizdomas, ka tās varētu būt prehaptēni/prohaptēni) negatīvi rezultāti jāinterpretē piesardzīgi, testa *IL-8 Luc* datu kopā pareizi ir 11 no 11 slēdzieniem prehaptēnu gadījumā, 6 no 6 slēdzieniem prohaptēnu gadījumā un 6 no 8 slēdzieniem prehaptēnu/prohaptēnu gadījumā (2). Balstoties uz neseno visaptverošo apskatu par trīs bezdzīvnieku testiem (*DPRA*, *KeratinoSens™* un *h-CLAT*), ko izmanto prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanai (9), un arī apstākli, ka testā *IL-8 Luc* izmantotās THP-G8 šūnas pieder pie *h-CLAT* izmantotās šūnu līnijas THP-1, testa *IL-8 Luc* iekļaušana citu testu kombinācijā var uzlabot bezdzīvnieku testu jutību prehaptēnu un prohaptēnu noteikšanā. Līdz šim testētie virsmaktīvie aģenti neatkarīgi no tipa (piem., katjoniski, anjoniski, nejoniski) devuši (pseido)pozitīvus rezultātus. Visbeidzot, ķimikālijas, kas ietekmē luciferāzi, var radīt maldīgu priekšstatu par tās aktivitāti vai ietekmēt mērījumus, izraisot vai nu šķietamu inhibēšanos, vai pastiprinātu luminiscenci (10). Piem., ir ziņots, ka fitoestrogēna koncentrācijas, kas lielākas par 1 μM, citos uz luciferāzi balstītos reportiergēnu testos radījušas luminiscences signālu traucējumus luciferāzes reportiergēna pārmērīgas aktivācijas dēļ. Tāpēc luciferāzes ekspresija, kas iegūta pie augstām fitoestrogēnu koncentrācijām vai augstām tādu savienojumu koncentrācijām, kuri domājami izraisa fitoestrogēnisku luciferāzes reportiergēna aktivāciju, ir rūpīgi jāizmeklē (11). Ņemot vērā visus šos apsvērumus, virsmaktīvie aģenti, anhidrīdi un ķimikālijas, kas ietekmē luciferāzi, ir ārpus šā testa izmantojamības lauka. Gadījumos, kad ir liecības, ka tests *IL-8 Luc* nav izmantojams vēl citu konkrētu kategoriju testējamajām ķimikālijām, to attiecīgo kategoriju ķimikālijām neizmanto.

6. Kā norādīts iepriekš, tests *IL-8 Luc* palīdz ādas sensibilizatorus nošķirt no ādas nesensibilizatoriem. Lai noskaidrotu, vai *IL-8 Luc* rezultāti kombinācijā ar citiem informācijas avotiem var palīdzēt novērtēt potenci, ir vajadzīga papildu informācija, vēlams, balstīta uz datiem par cilvēku.

▼M8

7. Definīcijas ir sniegtas 3.1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

8. Tests *IL-8 Luc* izmanto cilvēka monocītiskās leikēmijas šūnu līniju THP-1, kas iegūta no Amerikas tipveida kultūru kolekcijas (Manasasa, VA, ASV). Tohoku Universitātes Medicīnas augstskolas Dermatoloģijas departaments, izmantojot šo šūnu līniju, izveidoja no THP-1 iegūtu IL-8 reportieršūnu līniju THP-G8, kurā ir luciferāzes gēni *Stable Luciferase Orange* (*SLO*) un *Stable Luciferase Red* (*SLR*), ko kontrolē attiecīgi IL-8 un gliceraldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzes (*GAPDH*) promoteri (1). Tas ļauj kvantitatīvi izmērīt luciferāzes gēna indukciju, detektējot luminiscenci no labi zināmiem gaismu izstarojošiem luciferāzes substrātiem, kas kalpo par IL-8 un *GAPDH* aktivitātes rādītāju šūnās pēc to ekspozīcijas sensibilizējošām ķimikālijām.

9. Divkrāsu testa sistēmu veido viena oranžo izstarojoša luciferāze (*SLO*; λmaks. = 580 nm) (12) IL-8 promotera gēnu ekspresijai un sarkano izstarojoša luciferāze (*SLR*; λmaks. = 630 nm) (13) iekšējās kontroles promotera *GAPDH* gēnu ekspresijai. Reaģējot ar jāņtārpiņu d-luciferīnu, šīs divas luciferāzes izstaro dažādas krāsas, un to luminiscenci vienlaicīgi mēra viensoļa reakcijā, testa maisījuma izstaroto gaismu sadalot ar optisko filtru (14) (3.2. papildinājums).

10. THP-G8 šūnas 16 stundas apstrādā ar testējamo ķimikāliju; pēc tam mēra *SLO* luciferāzes aktivitāti (*SLO-LA*), kas atspoguļo IL-8 promotera aktivitāti, un *SLR* luciferāzes aktivitāti (*SLR-LA*), kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti. Lai saīsinājumus būtu vieglāk uztvert, *SLO-LA* un *SLR-LA* sauc attiecīgi par *IL8LA* un *GAPLA*. Apzīmējumi, kas saistīti ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc*, definēti 1. tabulā. Izmantojot mērījumu vērtības, aprēķina normalizēto *IL8LA* (*nIL8LA*), kas *IL8LA* un *GAPLA* attiecība, *nIL8LA* (*Ind-IL8LA*) indukciju, kas ir ar testējamo ķimikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* četrkārt mērītu vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *nIL8LA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība, un *GAPLA* (*Inh-GAPLA*) inhibēšanos, kas ir ar testējamo ķimikāliju apstrādātu THP-G8 šūnu četrkārt mērītu *GAPLA* vērtību un neapstrādātu THP-G8 šūnu *GAPLA* vērtību aritmētisko vidējo attiecība un ko izmanto par citotoksicitātes indikatoru.

1. tabula.

Ar luciferāzes aktivitāti testā *IL-8 Luc* saistīto apzīmējumu definīcijas

Abreviatūra	Definīcija
GAPLA	*SLR* luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti
IL8LA	*SLO* luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo *IL-8* promotera aktivitāti
nIL8LA	*IL8LA*/*GAPLA*
Ind-IL8LA	Ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *nIL8LA* / neapstrādāto šūnu *nIL8LA*

▼M8

Abreviatūra	Definīcija
Inh-GAPLA	Ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA* / neapstrādāto šūnu *GAPLA*
CV_{05}	Zemākā ķimikālijas koncentrācija, pie kuras *Inh-GAPLA* ir < 0,05

11. Lai būtu vieglāk validēt modificētus *in vitro* IL-8 luciferāzes testus, kas līdzinās testam *IL-8 Luc*, un lai ESAO testēšanas vadlīniju Nr. 442E būtu iespējams savlaicīgi attiecīgi grozīt ar mērķi šos testus tajā iekļaut, ir pieejami veiktspējas standarti (VS) (15) Attiecībā uz testiem, kas validēti saskaņā ar VS, ESAO datu savstarpējā atzīšana (*Mutual Acceptance of Data*, *MAD*) būs garantēta tikai tad, ja ESAO šos testus būs izskatījusi un iekļāvusi attiecīgajā testēšanas vadlīnijā Nr. 442E (16).

KOMPETENCES PIERĀDĪŠANA

12. Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām, ievērojot labu *in vitro* metožu praksi (17), jāpierāda sava tehniskā kompetence, izmantojot 3.3. papildinājumā uzskaitītās 10 standartvielas. Testa lietotājiem turklāt jāuztur vēsturiska datubāze ar datiem, kas iegūti reaģētspējas pārbaudēs (sk. 15. punktu) un ar pozitīvajām un šķīdinātāja/nesēja kontrolēm (sk. 21.–24. punktu), un ar šo datu palīdzību jāpārliecinās, ka laika gaitā testa reproducējamība konkrētajā laboratorijā saglabājas tāda pati.

PROCEDŪRA

13. Testam *IL-8 Luc* ir pieejama standartprocedūra, kas jāizmanto, veicot šo testu (18). Laboratorijas, kas vēlas šo testu veikt, rekombinanto šūnu līniju THP-G8 var iegūt no *GPC Lab. Co. Ltd.* (Totori, Japāna), iepriekš parakstot ESAO parauga nosacījumiem atbilstošu materiālu nodošanas līgumu. Galveno testa komponentu un procedūru apraksts sniegts nākamajos punktos.

Šūnu sagatavošana

14. Testam *IL-8 Luc* izmanto šūnu līniju THP-G8 no *GPC Lab. Co. Ltd.* (Totori, Japāna) (sk. 8. un 13. punktu). Saņemtās šūnas pavairo (2–4 pasāžas) un uzglabā sasaldētas kā viendabīgu krājumu. Šā krājuma šūnas var pavairot līdz maksimāli 12 pasāžām vai maksimāli 6 nedēļas. Pavairošanai izmanto kultūras barotni RPMI-1640, kurā ir 10 % liellopu embriju seruma (*foetal bovine serum*, *FBS*), antibiotisks/antimikotisks šķīdums (100 U/ml penicilīna G, 100 µg/ml streptomicīna un 0,25 µg/ml amfotericīna B 0,85 % fizioloģiskajā šķīdumā) (piem., GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml puromicīna (piem., *CAS* Nr. 58-58-2) un 300 µg/ml G418 (piem., *CAS* Nr. 108321-42-2).

15. Pirms šūnu izmantošanas testēšanai tās jākvalificē, pārbaudot to reaģētspēju. Šī pārbaude jāveic 1–2 nedēļas vai 2–4 pasāžas pēc atkausēšanas, izmantojot pozitīvo kontroli, 4-nitrobenzilbromīdu (4-NBB) (*CAS* Nr. 100-11-8, ≥ 99 % tīrība), un negatīvo kontroli, pienskābi (PS) (*CAS* Nr. 50-21-5, ≥ 85 % tīrība). 4-NBB jāizsauc pozitīva *Ind-IL8LA* (≥ 1,4) atbildreakcija, savukārt PS — negatīva (< 1,4). Testam izmanto tikai šūnas, kas izturējušas reaģētspējas pārbaudi. Pārbaude veicama saskaņā ar 22.–24. punktā aprakstītajām procedūrām.

▼M8

16. Testēšanas vajadzībām THP-G8 šūnas uzsēj blīvumā 2 līdz 5×10^5 šūnas/ml un kultivēšanas kolbās priekškultivē attiecīgi 48 vai 96 stundas. Testēšanas dienā no kultivēšanas kolbas ievāktās šūnas noskalo ar RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, un resuspendē RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS* bez antibiotikām, blīvumā 1×10^6 šūnas/ml. Tad šūnas sadala melnā 96 plakandibena iedobju platē (piem., Costar Cat#3603), izmantojot 50 µl (5×10^4 šūnas uz iedobi).

Testējamās ķimikālijas un kontroles vielu sagatavošana

17. Testējamo ķimikāliju un kontroles vielas sagatavo testēšanas dienā. Testā *IL-8 Luc* testējamās ķimikālijas izšķīdina X-VIVO™ 15, komerciāli pieejamā bezseruma barotnē (Lonza, 04-418Q), līdz galīgajai koncentrācijai 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 pievieno 20 mg testējamās ķimikālijas (neatkarīgi no ķimikālijas šķīdības) mikrocentrifūgas stobriņā, papildina līdz 1 ml tilpumam un tad 30 min intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, apkārtējās vides temperatūrā (aptuveni 20 °C). Ja cietas ķimikālijas joprojām nešķīst, stobriņu turklāt sonicē (apstrādā ar skaņu), līdz ķimikālija pilnīgi izšķīdusi vai stabili disperģēta. Ja testējamā ķimikālija X-VIVO™ 15 šķīst, šķīdumu ar X-VIVO™ 15 atšķaida, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5, un izmanto par testējamās ķimikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Ja testējamā ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, maisījumu atkal vismaz 30 min rotē un tad 5 min centrifugē ar 15000 apgr./min (≈20000*g*); iegūto supernatantu izmanto par testējamās ķimikālijas izejšķīdumu X-VIVO™ 15. Citu šķīdinātāju (piem., DMSO, ūdens vai kultūras barotnes) izmantošana zinātniski jāpamato. Ķimikāliju šķīdināšanas procedūra ir detalizēti aprakstīta 3.5. papildinājumā. 18.–23. punktā aprakstītos X-VIVO™ 15 šķīdumus attiecībā 1:1 (tilp./tilp.) samaisa ar melnajā 96 plakandibena iedobju platē sagatavotajām šūnu suspensijām (sk. 16. punktu).

18. Pirmās testa izpildes reizes mērķis ir noteikt citotoksisko koncentrāciju un novērtēt ķimikāliju ādas sensibilizācijas potenciālu. Izmantojot X-VIVO™ 15, 96 iedobju testa blokā (piem., Costar Cat#EW-01729-03) izdara testējamās ķimikālijas un X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveida atšķaidījumus ar atšķaidījuma koeficientu divi (sk. 3.5. papildinājumu). Pēc tam melnā 96 plakandibena iedobju platē 50 µl šūnu suspensijas pievieno 50 µl atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Tātad testējamajām ķimikālijām, kas šķīst X-VIVO™ 15, testējamo ķimikāliju galīgās koncentrācijas ir diapazonā no 0,002 līdz 2 mg/ml (3.5. papildinājums). Testējamajām ķimikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, nosaka tikai atšķaidījuma koeficientus diapazonā no 2 līdz 2^{10}, lai gan testējamo ķimikāliju faktiskās galīgās koncentrācijas nav droši zināmas un ir atkarīgas no tā, cik piesātināts ir izejšķīdums — testējamās ķimikālijas šķīdums X-VIVO™ 15.

19. Nākamajās testa izpildes reizēs (t. i., otrais, trešais un ceturtais replikāts) X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo koncentrācijā, kas četrkārtīgi pārsniedz šūnu dzīvotspējas koncentrāciju 05 (CV_{05} — zemākā koncentrācija, pie kuras *Inh-GAPLA* ir < 0,05) pirmajā eksperimentā. Ja pirmajā izpildes reizē *Inh-GAPLA* pie augstākās koncentrācijas nesamazinās zem 0,05, X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sagatavo augstākajā pirmās izpildes reizes koncentrācijā. CV_{05} koncentrāciju aprēķina, pirmās izpildes reizes izejšķīduma koncentrāciju dalot ar CV_{05} atšķaidījuma koeficientu (X) (atšķaidījuma koeficients CV_{05} (X) — atšķaidījuma koeficients, kas vajadzīgs izejšķīduma atšķaidīšanai līdz CV_{05}) (3.5. papildinājums). Ja testējamā viela X-VIVO koncentrācijā 20 mg/ml nešķīst, CV_{05} nosaka pēc izejšķīduma koncentrācijas × 1/X. 2. līdz 4. izpildes reizei sagatavo otru izejšķīdumu — 4 × CV_{05} (3.5. papildinājums).

▼**M8**

20. Otro X-VIVO™ 15 izejšķīdumu sērijveidā atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 1,5, izmantojot 96 iedobju testa bloku. Pēc tam melnā 96 plakandibena iedobju platē 50 µl šūnu suspensijas pievieno 50 µl atšķaidītā šķīduma uz iedobi. Katra testējamā ķimikālija katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Pēc tam paraugus samaisa ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē 37 °C un pie 5 % CO_2; tad, kā aprakstīts tālāk, izmēra luciferāzes aktivitāti.

21. Šķīdinātāja kontrole ir šāds maisījums: 50 µl X-VIVO™ 15 un 50 µl šūnu suspensijas RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, uz iedobi.

22. Par pozitīvo kontroli ieteicams izmantot 4-NBB. 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg 4-NBB, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml. Stobriņu intensīvi vorteksē un krata ar rotoru, kura maksimālais ātrums ir 8 apgr./min, vismaz 30 min. Pēc 5 min ilgas centrifugēšanas (20000 g) supernatantu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 4, un 500 µl atšķaidītā supernatanta pārvieto uz iedobi 96 iedobju testa blokā. Atšķaidīto supernatantu vēl atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientus 2 un 4, un 50 µl šķīduma pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijai melnas 96 plakandibena iedobju plates iedobēs (3.6. papildinājums). Pozitīvā kontrole katrā koncentrācijā jātestē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO_2 inkubatorā (37 °C, 5 % CO_2); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.

23. Par negatīvo kontroli ieteicams izmantot pienskābi (PS). 1,5 ml mikrofūgas stobriņā sagatavo 20 mg PS, kam pievieno X-VIVO™ 15 līdz 1 ml (20 mg/ml). 20 mg/ml PS šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 5 (4 mg/ml); 500 µl šā 4 mg/ml PS šķīduma pārvieto uz 96 iedobju testa bloka iedobi. Šo šķīdumu atšķaida ar X-VIVO™ 15, izmantojot atšķaidījuma koeficientu 2, un tad vēlreiz atšķaida ar atšķaidījuma koeficientu 2, iegūstot šķīdumus ar koncentrāciju 2 mg/ml un 1 mg/ml. 50 µl šo 3 šķīdumu un šķīdinātāja kontroles (X-VIVO™ 15) pievieno 50 µl THP-G8 šūnu suspensijas melnas 96 plakandibena iedobju plates iedobēs. Negatīvo kontroli katrā koncentrācijā testē 4 iedobēs. Plati sakrata ar plates kratītāju un uz 16 h inkubē CO_2 inkubatorā (37 °C, 5 % CO_2); pēc tam izmēra luciferāzes aktivitāti, kā aprakstīts 29. punktā.

24. Ja ir pieejami vēsturiskie dati, no kuriem var iegūt salīdzināmus izpildes reižu pieņemamības kritērijus, var izmantot citas piemērotas pozitīvās vai negatīvās kontroles.

25. Jāizvairās no gaistošu testējamo ķimikāliju iztvaikošanas un testējamo ķimikāliju starpiedobju kontaminācijas, piem., pirms inkubēšanas ar testējamajām ķimikālijām plati noslēdzot.

26. Lai iegūtu pozitīvu vai negatīvu prognozi, ar testējamajām ķimikālijām un šķīdinātāja kontroli vajadzīgas 2 līdz 4 izpildes reizes (sk. 2. tabulu). Katru izpildes reizi veic citā dienā ar svaigu X-VIVO™ 15 izejšķīdumu un neatkarīgi ievāktām šūnām. Šūnas var būt no vienas un tās pašas pasāžas.

▼M8

Luciferāzes aktivitātes mērījumi

27. Luminiscenci mēra, izmantojot 96 iedobju mikroplates luminometru ar optiskajiem filtriem, piem., *Phelios* (*ATTO*, Tokija, Japāna), *Tristan 941* (*Berthold*, Bādvildbāde, Vācija) vai *ARVO* (*PerkinElmer*, Voltema, MA, ASV). Lai nodrošinātu reproducējamību, luminometrs katram testam jākalibrē (19). Šai kalibrēšanai pieejamas rekombinantās luciferāzes, kas izstaro oranžu un sarkanu gaismu.

28. Uz katru plates iedobi, kurā ir ar ķimikāliju apstrādāta vai neapstrādāta šūnu suspensija, pārnes 100 µl iepriekš sasildīta testa reaģenta *Tripluc® Luciferase* (*Tripluc*). Plati 10 minūtes krata apkārtējās vides temperatūrā — aptuveni 20 °C. Luciferāzes aktivitātes mērīšanai plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katrreiz 3 s. Citu iestatījumu izmantošanas gadījumā (piem., atkarībā no izmantotā luminometra modeļa) jāsniedz pamatojums.

29. Parametrus katrai koncentrācijai aprēķina, par pamatu ņemot izmērītās vērtības (piem., *IL8LA*, *GAPLA*, *nIL8LA*, *Ind-IL8LA*, *Inh-GAPLA*, *IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *nIL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Ind-IL8LA* vidējā vērtība ± standartnovirze, *Inh-GAPLA* vidējā vērtība ± standartnovirze un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls). Šajā punktā izmantoto parametru definīcijas sk. attiecīgi 3.1 un 3.4. papildinājumā.

30. Daudzkrāsu reportieru testos pirms mērīšanas parasti panāk krāsu izšķiršanu ar detektoriem (luminometru un plašu lasītāju), kas aprīkoti ar optiskajiem filtriem, piem., sliekšņfiltriem [*sharp-cut filters*] (garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtriem) vai frekvenču joslas filtriem. Pirms testēšanas saskaņā ar 3.2. papildinājumu jākalibrē filtru pārvades koeficienti katrai bioluminiscences signālkrāsai.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Datu izvērtēšana

31. Lai iegūtu pozitīvu/negatīvu prognozi, katrai izpildes reizei jāatbilst šādiem kritērijiem:

— uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir pozitīva, ja testējamās ķimikālijas *Ind-IL8LA* ≥ 1,4 un *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža ≥ 1,0;

— uzskata, ka testa *IL-8 Luc* prognoze ir negatīva, ja testējamās ķimikālijas *Ind-IL8LA* < 1,4 un/vai *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāla apakšējā robeža < 1,0.

Prognozes modelis

32. Testējamās ķimikālijas, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti divi pozitīvi rezultāti, uzskata par pozitīvām, savukārt tās, attiecībā uz kurām 1., 2., 3. un 4. reizē gūti trīs negatīvi rezultāti, uzskata par potenciāli negatīvām (2. tabula). No potenciāli negatīvām ķimikālijām ķimikālijas, kas X-VIVO™ 15 izšķīdušas koncentrācijā 20 mg/ml, uzskata par negatīvām, savukārt par ķimikālijām, kas X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml nav izšķīdušas, spriedumu neizdara (1. attēls).

▼M8

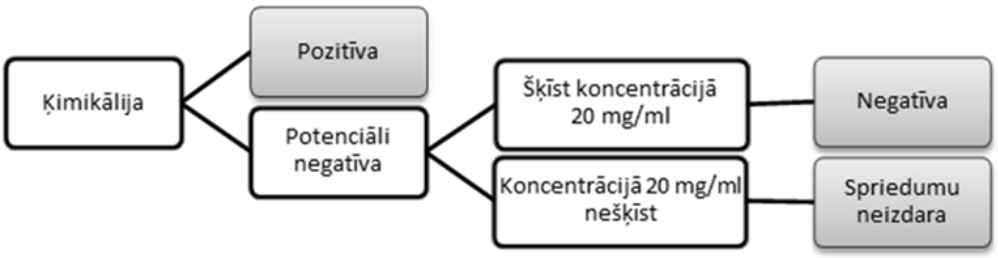
2. tabula.

Pozitīvu un potenciāli negatīvu ķimikāliju identificēšanas kritēriji

1. izpildes reize	2. izpildes reize	3. izpildes reize	4. izpildes reize	Galīgā prognoze
Pozitīva	Pozitīva	—	—	Pozitīva
	Negatīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	—	Pozitīva
		Negatīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
	Negatīva	Pozitīva	Pozitīva	Pozitīva
			Negatīva	Potenciāli negatīva
		Negatīva	—	Potenciāli negatīva

1. attēls.

Galīgā slēdziena prognozes modelis



Pieņemamības kritēriji

33. Izmantojot testu *IL-8 Luc*, jābūt izpildītiem šādiem pieņemamības kritērijiem:

— *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jāpārsniedz 5,0 vismaz vienā pozitīvās kontroles, 4-NBB, koncentrācijā;

— *Ind-IL8LA* vērtībai katrā izpildes reizē jābūt mazākai par 1,4 vismaz vienā negatīvās kontroles, pienskābes, koncentrācijā;

— datus no platēm, kuru kontroles iedobēs ar šūnām un *Tripluc*, bet bez ķimikālijām *GAPLA* vērtība mazāk nekā pieckārtīgi pārsniedz šo vērtību iedobēs, kurās ir tikai testa barotne (50 µl RPMI-1640, kas satur 10 % *FBS*, un 50 µl X-VIVO^{TM} 15 uz iedobi), atmet;

— datus no platēm, kurās *Inh-GAPLA* vērtība pie visām testējamo vai kontroles ķimikāliju koncentrācijām ir mazāka nekā 0,05, atmet; tādā gadījumā pirmo testu atkārto tā, lai atkārtotā testa augstākā galīgā koncentrācija būtu iepriekšējā testa zemākā galīgā koncentrācija.

▼M8

Testēšanas pārskats

34. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamās ķimikālijas

Vienkomponenta viela:

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/-nesēja izvēles pamatojums

Daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi

— Iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām

— Izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Molekulmasa vai šķietamā molekulmasa, ja tas ir maisījums/polimērs ar zināmu sastāvu, vai cita pētījuma norisei relevanta informācija

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Šķīdība X-VIVO™ 15. Ja ķimikālija X-VIVO™ 15 nešķīst, norāda, vai pēc centrifugēšanas novērojama izgulsnēšanās vai flotācija

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Ja neizmanto X-VIVO™ 15: katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja/-nesēja izvēles pamatojums

Kontroles

Pozitīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i), *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula un/vai citi identifikācijas dati

— Izskats, šķīdība ūdenī, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama (attiecīgā gadījumā)

▼M8

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Pirmstestēšanas apstrāde, ja tāda veikta (piem., sildīšana, smalcināšana)

— Testētās koncentrācijas

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Norāde uz vēsturiskajiem pozitīvo kontroļu rezultātiem, kas apliecina atbilstību piemērotiem pieņemamības kritērijiem (attiecīgā gadījumā)

Negatīvā kontrole

— Ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums(-i), *CAS* numurs(-i) un/vai citi identifikācijas dati

— Tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (attiecīgā gadījumā, ja šī informācija ir pieejama) utt.

— Ja tiek izmantotas citas (testēšanas vadlīnijā neminētas) negatīvās kontroles: izskats, molekulmasa un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Glabāšanas apstākļi un stabilitāte, ciktāl šī informācija ir pieejama

— Katras testējamās ķimikālijas šķīdinātāja izvēles pamatojums

Testa apstākļi

— Sponsora, testējošās iestādes, pētījuma vadītāja vārds/nosaukums un adrese

— Izmantotā testa apraksts

— Izmantotā šūnu līnija, tās glabāšanas apstākļi un avots (piem., iestāde, no kuras tā saņemta)

— *FBS* partijas numurs un izcelsme, melnās 96 plakandibena iedobju plates partijas numurs un reaģenta *Tripluc* partijas numurs

— Testēšanā izmantoto šūnu pasāžu skaits un blīvums

— Šūnu skaitīšanas metode, kas izmantota uzsēšanai pirms testēšanas, un pasākumi, kas veikti, lai nodrošinātu šūnu viendabīgu sadalījumu skaita ziņā

— Izmantotais luminometrs (piem., modelis), arī instrumentu iestatījumi, izmantotais luciferāzes substrāts un pienācīgu luminiscences mērījumu pierādīšana ar 3.2. papildinājumā aprakstīto kontroltestu

— Procedūra, ar kuru pierādīta laboratorijas kompetence izmantot šo testēšanas metodi (piem., testējot standartvielas) vai apliecināta testēšanas metodes ilgstoša reproducējamība

Testa procedūra

— Replikātu un izpildes reižu skaits

— Testējamās ķimikālijas koncentrācijas, aplicēšanas procedūras un ekspozīcijas laiks (ja atšķiras no rekomendētajiem)

▼**M8**

— Izmantoto izvērtēšanas un lēmuma pieņemšanas kritēriju apraksts

— Izmantoto pētījuma pieņemamības kritēriju apraksts

— Testa procedūras modifikāciju apraksts, ja tādas bijušas

Rezultāti

— *IL8LA* un *GAPLA* mērījumi

— *nIL8LA*, *Ind-IL8LA* un *Inh-GAPLA* aprēķini

— *Ind-IL8LA* 95 % ticamības intervāls

— Grafiks, kurā attēlotas devas–atbildreakcijas līknes attiecībā uz luciferāzes aktivitātes inducēšanos un dzīvotspēju

— Jebkādu citu relevantu novērojumu apraksts (attiecīgā gadījumā)

Rezultātu iztirzājums

— Ar testu *IL-8 Luc* iegūto rezultātu iztirzājums

— Testa rezultātu apskats *IATA* kontekstā, ja pieejama cita relevanta informācija

Secinājums

LITERATŪRA

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and 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 124:359-69.

(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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: 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 & Assessment No 256, ENV/JM/-MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and 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). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and 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, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(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, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

3.1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Pareizība: pakāpe, kādā testa rezultāti sakrīt ar pieņemtajām references vērtībām. Tas ir testa veiktspējas raksturlielums un viens no tā relevantuma aspektiem. Ar šo terminu, tāpat kā terminu "konkordantums", bieži vien saprot testa pareizo iznākumu īpatsvaru (16).

AOP (nelabvēlīga iznākuma ceļš):: no mērķķimikālijas vai līdzīgu ķimikāliju grupas ķīmiskās struktūras izrietoša notikumu sekvence no molekulārā iniciācijas notikuma līdz interesējošajam *in vivo* iznākumam (20).

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV05: šūnu dzīvotspēja 05, t. i., minimālā koncentrācija, pie kuras ķimikāliju *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.

FInSLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Ind-IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *Ind-IL8LA*.

GAPLA: luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Red* (*SLR*) (λmaks. = 630 nm), ko regulē *GAPDH* promoters un kas uzrāda šūnu dzīvotspēju un dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Bīstamība: tāda aģenta vai situācijas iedabiska īpašība, kam piemīt potenciāls atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz šim aģentam eksponētu organismu, sistēmu vai (apakš)populāciju.

IATA (integrētā testēšanas un novērtēšanas pieeja):: strukturēta pieeja, ko izmanto ķimikālijas vai ķimikāliju grupas bīstamības identificēšanai (potenciāls), bīstamības raksturošanai (potence) un/vai drošuma novērtēšanai (potenciāls/potence un ekspozīcija) un kas stratēģiskā veidā integrē un izsver visus relevantos datus, lai varētu pieņemt normatīvu lēmumu par potenciālo bīstamību un/vai risku, un/vai nepieciešamību veikt turpmāku selektīvu un līdz ar to minimālu testēšanu.

II-SLR-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *Inh-GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *Inh-GAPLA*.

IL-8 (interleikīns-8): no endotēlijšūnām, fibroblastiem, keratinocītiem, makrofāgiem un monocītiem iegūts citokīns, kas izraisa neitrofilu un T šūnu limfocītu hemotaksi.

IL8LA: luciferāzes aktivitāte, kas raksturīga *Stable Luciferase Orange* (*SLO*) (λmaks. = 580 nm), ko regulē IL-8 promoters.

Ind-IL8LA: inducēšanās pakāpe. To iegūst, ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *nIL8LA* dalot ar nestimulēto THP-G8 šūnu *nIL8LA*, un šī vērtība izsaka, kādā mērā ķimikālijas inducē IL-8 promotera aktivitāti.

Inh-GAPLA GAPLA: inhibēšanās. To iegūst, ar ķimikālijām apstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA* dalot ar neapstrādāto THP-G8 šūnu *GAPLA*, un šī vērtība izsaka ķimikāliju citotoksiskumu.

Minimālais inducēšanas slieksnis (MIS): zemākā koncentrācija, pie kuras ķimikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

▼M8

Maisījums: maisījums vai šķīdums, kas sastāv no divām vai vairāk vielām.

Vienkomponenta viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā viena galvenā sastāvdaļa veido vismaz 80 % (masa/masa).

Daudzkomponentu viela: tāda viela, definēta ar tās kvantitatīvo sastāvu, kurā vairāk nekā viena no galvenajām sastāvdaļām ir koncentrācijā ≥ 10 % (masa/masa) un < 80 % (masa/masa). Daudzkomponentu vielas tiek iegūtas ražošanas procesā. Atšķirība starp maisījumu un daudzkomponentu vielu ir tāda, ka maisījumu iegūst, divas vai vairākas vielas sajaucot bez ķīmiskas reakcijas. Daudzkomponentu vielas rodas ķīmiskās reakcijās.

nIL8LA SLO: luciferāzes aktivitāte, kas atspoguļo IL-8 promotera aktivitāti (*IL8LA*), normalizēta ar *SLR* luciferāzes aktivitāti, kas atspoguļo *GAPDH* promotera aktivitāti (*GAPLA*). Tā izsaka IL-8 promotera aktivitāti pēc tam, kad ņemta vērā šūnu dzīvotspēja vai šūnu skaits.

nSLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *nIL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *nIL8LA*.

Pozitīvā kontrole: replikāts, kurā ir visi testa sistēmas komponenti un kurš apstrādāts ar vielu, par ko ir zināms, ka tā inducē pozitīvu atbildreakciju. Lai būtu iespējams novērtēt pozitīvās kontroles atbildreakcijas mainību laikā, pozitīvās atbildreakcijas intensitāte nedrīkstētu būt pārlieku liela.

Prehaptēni: ķimikālijas, kas par sensibilizatoriem kļūst abiotiskas transformācijas procesā.

Prohaptēni: ķimikālijas, kuru ādas sensibilizācijas potenciālu atraisa fermentatīva aktivācija.

Relevantums: parametrs, kas raksturo testa attiecināmību uz interesējošo ietekmi un to, vai testu lietot konkrētam nolūkam ir jēgpilni un noderīgi. Pakāpe, kādā ar testu var pareizi izmērīt vai prognozēt interesējošo bioloģisko ietekmi. Relevantums ietver arī testa pareizības (konkordantuma) aspektu (16).

Ticamība: parametrs, kas izsaka, kādā pakāpē, izmantojot vienu un to pašu protokolu, testu vienā un tajā pašā laboratorijā vai dažādās laboratorijās ilgākā laika nogrieznī var veikt reproducējami. To novērtē, aprēķinot metodes intralaboratorisko un interlaboratorisko reproducējamību un intralaboratorisko atkārtojamību (16).

Izpildes reize: reize, kurā vienu vai vairākas ķimikālijas testē paralēli ar šķīdinātāja/nesēja kontroli un pozitīvo kontroli.

Jutība: tas, cik liela daļa no visām pozitīvajām/aktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

SLO-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *IL8LA*. Definīciju sk. ierakstā par *IL8LA*.

SLR-LA: validācijas ziņojumā un iepriekšējās publikācijās par testu *IL-8 Luc* lietota abreviatūra, ar ko apzīmē *GAPLA*. Definīciju sk. ierakstā par *GAPLA*.

▼M8

Šķīdinātāja/nesēja kontrole: neapstrādāts paraugs, kurā ir visi testa sistēmas komponenti, izņemot testējamo ķimikāliju, bet ieskaitot izmantoto šķīdinātāju/-nesēju. To izmanto, lai noteiktu bāzlīnijas atbildreakciju paraugiem, kas apstrādāti ar attiecīgajā šķīdinātājā/nesējā izšķīdinātu vai stabili disperģētu testējamo ķimikāliju. Ja testā izmanto arī paralēlu barotnes kontroli, šis paraugs parāda arī to, vai šķīdinātājs/nesējs mijiedarbojas ar testa sistēmu.

Specifiskums: tas, cik liela daļa no visām negatīvajām/neaktīvajām ķimikālijām ar testu tiek klasificētas pareizi. Tas ir tāda testa pareizības mērs, ar kuru iegūst kategoriālus rezultātus, un svarīgs faktors testa relevantuma izvērtēšanā (16).

Viela: ķīmisks elements un tā dabiski radušies vai ražošanas procesā iegūti savienojumi, ieskaitot to stabilizācijai vajadzīgās piedevas, kā arī izmantotajos procesos radušos piejaukumus, bet izņemot šķīdinātājus, kurus var atdalīt, neietekmējot vielas stabilitāti un neizmainot tās sastāvu.

Virsmaktīvs aģents: viela, piem., detergents, kas var samazināt šķidruma virsmas spraigumu un tādējādi ļauj tam putot vai penetrēt cietvielas; to dēvē arī par mitrinātāju. (*TG437*)

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo metodi.

THP-G8 testā *IL-8 Luc*: izmantota IL-8 reportieršūnu līnija. Cilvēka makrofāgiskā šūnu līnija THP-1, kura transficēta ar luciferāzes *SLO* un *SLR* gēniem attiecīgi IL-8 un *GAPDH* promoteru kontrolē.

Apvienoto Nāciju Organizācijas Ķimikāliju klasificēšanas un marķēšanas globāli harmonizētā sistēma (ANO GHS): sistēma, kurā ķimikālijas (vielas un maisījumus) klasificē pēc standartizētiem fizisko apdraudējumu, veselības apdraudējumu un vidisko apdraudējumu tipiem un līmeņiem un kura paredz atbilstošus saziņas elementus, piem., piktogrammas, signālvārdus, bīstamības apzīmējumus, drošības prasību apzīmējumus un drošības datu lapas, ar ko tiek sniegta informācija par ķimikāliju nelabvēlīgo ietekmi, tā aizsargājot cilvēkus (tostarp darba devējus, darba ņēmējus, transporta darbiniekus, patērētājus un avārijas dienestu darbiniekus) un vidi (21).

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

Derīga testēšanas metode: tests, kas tiek uzskatīts par pietiekami relevantu un ticamu konkrētam nolūkam un ir balstīts uz zinātniski pareiziem principiem. Tests nekad nav derīgs absolūtā izteiksmē; tas vienmēr ir derīgs tikai kādam konkrētam nolūkam.

▼M8

3.2. papildinājums

LUCIFERĀZES AKTIVITĀTES MĒRĪŠANAS PRINCIPS UN OPTISKO FILTRU PĀRVADES KOEFICIENTU NOTEIKŠANA SLO UN SLR

Daudzreportieru testa sistēmu *Tripluc* var izmantot ar mikroplates tipa luminometru, kam ir daudzu krāsu detektēšanas sistēma un ko var aprīkot ar optisko filtru (piem., *Phelios AB-2350* (*ATTO*), *ARVO* (*PerkinElmer*), *Tristar LB941* (*Berthold*)). Par optisko filtru mērīšanā izmanto 600–620 nm garviļņu vai īsviļņu caurlaides filtru vai 600–700 nm frekvenču joslas filtru.

Divu krāsu luciferāzu mērīšana ar optisko filtru

Šis ir piemērs, kurā izmantots *Phelios AB-2350* (*ATTO*). Šis luminometrs ir aprīkots ar 600 nm garviļņu caurlaides filtru (*R60 HOYA Co.*, 600 nm GCF, 1. filtrs) *SLO* (λmaks. = 580 nm) un *SLR* (λmaks. = 630 nm) luminiscences nošķiršanai.

Lai noteiktu 600 nm GCF pārvades koeficientus, vispirms, izmantojot attīrītus luciferāzes *SLO* un *SLR* fermentus, i) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti bez filtra (F0), ii) izmēra *SLO* un *SLR* bioluminiscences intensitāti caur 600 nm GCF (1. filtrs) un iii) aprēķina tālāk norādītos 600 nm GCF pārvades koeficientus attiecībā uz *SLO* un *SLR*.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Ja testa parauga *SLO* un *SLR* intensitāte ir attiecīgi O un R, tad i) gaismas intensitāte bez filtra (pilns optiskais spektrs) (F0) un ii) caur 600 nm GCP (1. filtru) pārvadītas gaismas intensitāte (F1) ir tāda, kā redzams šajās formulās.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Šīs formulas var izteikt arī šādi:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Tad, izmantojot aprēķinātos pārvades koeficientus (κO_{R60} un κR_{R60}) un izmērīto F0 un F1, O un R vērtību var aprēķināt šādi:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

Pārvades koeficientu noteikšanas materiāli un metodes

1) Reaģenti

Atsevišķi attīrīti luciferāzes fermenti:

liofilizēts attīrīts *SLO* ferments

liofilizēts attīrīts *SLR* ferments

(kas validācijas darba vajadzībām iegūti no *GPC Lab. Co. Ltd.*, Totori, Japāna, kopā ar šūnu līniju THP-G8)

Testa reaģents:

testa reaģents *Tripluc® Luciferase* (piem., no *TOYOBO Cat#MRA-301*)

Barotne: luciferāzes testam (30 ml, turēta 2–8 °C)

Reaģents	Koncentrācija	Galīgā koncentrācija barotnē	Vajadzīgais daudzums
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) Fermenta šķīduma sagatavošana

Liofilizētu attīrītu luciferāzes fermentu izšķīdina stobriņā, tam pievienojot 200 µl 10 ~ 100 mM Tris/HCl vai Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), kas papildināts ar 10 % (masa/tilp.) glicerīna, fermenta šķīdumu sadala 10 µl alikvotās vienreizlietojamos 1,5 ml stobriņos un -80 °C tur saldētavā. Sasaldēto fermenta šķīdumu pēc tam var izmantot 6 mēnešus. Kad šķīdumu izmanto, katram fermenta šķīduma (atšķaidīta fermenta šķīduma) stobriņam pievieno 1 ml luciferāzes testa barotnes (RPMI-1640 ar 10 % *FBS*) un to tur uz ledus, lai nenotiktu dezaktivācija.

3) Bioluminiscences mērīšana

Testa reaģentu *Tripluc*® *Luciferase* (*Tripluc*) atkausē un tur istabas temperatūrā vai nu ūdens vannā, vai apkārtējās vides temperatūrā. Luminometru ieslēdz 30 min pirms mērījumu sākšanas, lai fotoelektronpavairotājlampa nostabilizētos. 100 µl atšķaidītā fermenta šķīduma pārnes uz melnu 96 iedobju plati (plakandibena) (*SLO* referencparaugu uz #B1, #B2, #B3, *SLR* referencparaugu uz #D1, #D2, #D3). Tad 100 µl iepriekš sasildīta *Tripluc* ar automātisko pipeti pārnes uz katru plates iedobi, kurā ir atšķaidītais fermenta šķīdums. Ar plates kratītāju plati 10 min krata istabas temperatūrā (apm. 25 °C). Iedobēs šķīdumā likvidē burbuļus, ja tādi parādās. Lai izmērītu luciferāzes aktivitāti, plati ieliek luminometrā. Bioluminiscenci mēra gan bez optiskā filtra (F0), gan ar to (F1), katrreiz 3 s.

Optiskā filtra pārvades koeficientu aprēķina šādi:

pārvades koeficients (*SLO* (κO_{R60})) = (#B1 ar F1+ #B2 ar F1+ #B3 ar F1) / (#B1 ar F0+ #B2 ar F0+ #B3 ar F0)

▼**M8**

pārvades koeficients (*SLR* (κR_{R60})) = (#D1 ar F1+ #D2 ar F1+ #D3 ar F1) / (#D1 ar F0+ #D2 ar F0+ #D3 ar F0)

Aprēķinātos pārvades koeficientus izmanto visiem mērījumiem, ko veic ar to pašu luminometru.

Aprīkojuma kvalitātes kontrole

Jāizmanto *IL-8 Luc* protokolā aprakstītās procedūras (18).

▼**M8**

3.3. papildinājums

STANDARTVIELAS

Pirms šajā testēšanas metodes B.71 papildinājumā aprakstītā testa regulāras izmantošanas laboratorijām jāpierāda sava tehniskā kompetence, iegūstot paredzamo testa *IL-8 Luc* prognozi attiecībā uz 1. tabulā ieteiktajām 9 vielām un attiecībā uz vismaz 8 no 9 standartvielām (kas izraudzītas tā, lai būtu reprezentatīvas ādas sensibilizācijas atbildreakciju diapazonam) iegūstot vērtības, kuras ietilpst attiecīgajā references diapazonā. Citi atlases kritēriji bija vielu komerciālā pieejamība un kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vivo* references datu, kā arī kvalitatīvu ar testu *IL-8 Luc* iegūtu *in vitro* datu pieejamība. Par testu *IL-8 Luc* ir pieejami arī publicēti references dati (6) (1).

1. tabula.

Vielas, kuras ieteicams izmantot, lai pierādītu tehnisko kompetenci izmantot testu *IL-8 Luc*

Standartvielas	*CAS* Nr.	Agregātstāvoklis	Šķīdība X-VIVO™ 15 koncentrācijā 20 mg/ml	*In vivo* prognoze (1)	*IL-8 Luc* prognoze (2)	References diapazons (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	*IL-8 Luc* MIS (5)
2,4-dinitrohlorbenzols	97-00-7	ciets	nešķīst	sensibilizators (ļoti spēcīgs)	pozitīva	2,3–3,9	0,5–2,3
formaldehīds	50-00-0	šķidrs	šķīst	sensibilizators (spēcīgs)	pozitīva	9–30	4–9
2-merkaptobenztiazols	149-30-4	ciets	nešķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	250–290	60–250
etilēndiamīns	107-15-3	šķidrs	šķīst	sensibilizators (vidējs)	pozitīva	500–700	0,1–0,4
etilēnglikola dimetakrilāts	97-90-5	šķidrs	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,04–0,1
4-alilanizols (estragols)	140-67-0	šķidrs	nešķīst	sensibilizators (vājš)	pozitīva	> 2000	0,01–0,07
streptomicīna sulfāts	3810-74-0	ciets	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
glicerīns	56-81-5	šķidrs	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000
izopropanols	67-63-0	šķidrs	šķīst	nav sensibilizators	negatīva	> 2000	> 2000

Saīsinājumi: *CAS* Nr. — *Chemical Abstracts Service* reģistra numurs
(1) *In vivo* potence ir noteikta, izmantojot *ECETOC* ierosinātos kritērijus (19).
(2) Balstoties uz vēsturiski novērotajām vērtībām (1) (6).
(3) CV_{05} un *IL-8 Luc* MIS aprēķinātas ar *EPI Suite™* doto šķīdību ūdenī.
(4) CV_{05}: minimālā koncentrācija, pie kuras ķimikāliju uzrādītā *Inh-GAPLA* vērtība ir mazāka par 0,05.
(5) MIS: zemākā koncentrācija, pie kuras ķimikālija atbilst pozitīvuma kritērijiem.

▼M8

3.4. papildinājums

INDEKSI UN SLĒDZIENU KRITĒRIJI

nIL8LA (nSLO-LA)

Attiecīgi *IL8LA* (*SLO-LA*) un *GAPLA* (*SLR-LA*) mēra i-tās koncentrācijas (i = 0–11) j-to atkārtojumu (j = 1–4). Normalizētā *IL8LA*, ko dēvē par *nIL8LA* (*nSLO-LA*), ir definēta šādi:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Tā ir šā testa pamatmērvienība.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Atkārtojuma vidējotās *nIL8LA* (*nSLO-LA*) palielinājuma pakāpe pie i-tās koncentrācijas salīdzinājumā ar 0-to koncentrāciju, *Ind-IL8LA*, ir šā testa pamatmērs. Šo attiecību izsaka ar šādu formulu:

$$Ind - IL8LA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\right\}$$

Vadošā laboratorija ierosinājusi uzskatīt, ka pozitīvam testējamās ķimikālijas rezultātam atbilst vērtība 1,4. Šīs vērtības pamatā ir vadošās laboratorijas vēsturisko datu izpēte. Datu pārvaldības grupa šo vērtību izmantojusi visos validācijas pētījuma posmos. Primārais iznākums, *Ind-IL8LA*, ir divu aritmētisko vidējo attiecība, kā redzams vienādojumā.

95 % ticamības intervāls (95 % TI)

Balstoties uz šo attiecību, var aplēst 95 % ticamības intervālu (95 % TI), kas parāda, cik precīzs ir šis primārā iznākuma mērs. 95 % TI apakšējā robeža ≥ 1 liecina, ka *nIL8LA* pie i-tās koncentrācijas ir ievērojami lielāka nekā šķīdinātāja kontroles gadījumā. 95 % TI var iegūt vairākos veidos. Šajā pētījumā šādam nolūkam izmantota Fīlera [*Fieller*] teorēma. Pēc šīs teorēmas 95 % ticamības intervālu iegūst saskaņā ar šādu formulu:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

kur: .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

ir centrālā t sadalījuma 97,5. procentile ar brīvības pakāpes ν, kur

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA ir i-tās koncentrācijas atkārtojuma vidējotās *GAPLA* (*SLR-LA*) attiecība pret attiecīgo šķīdinātāja kontroles vērtību, un to izsaka

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

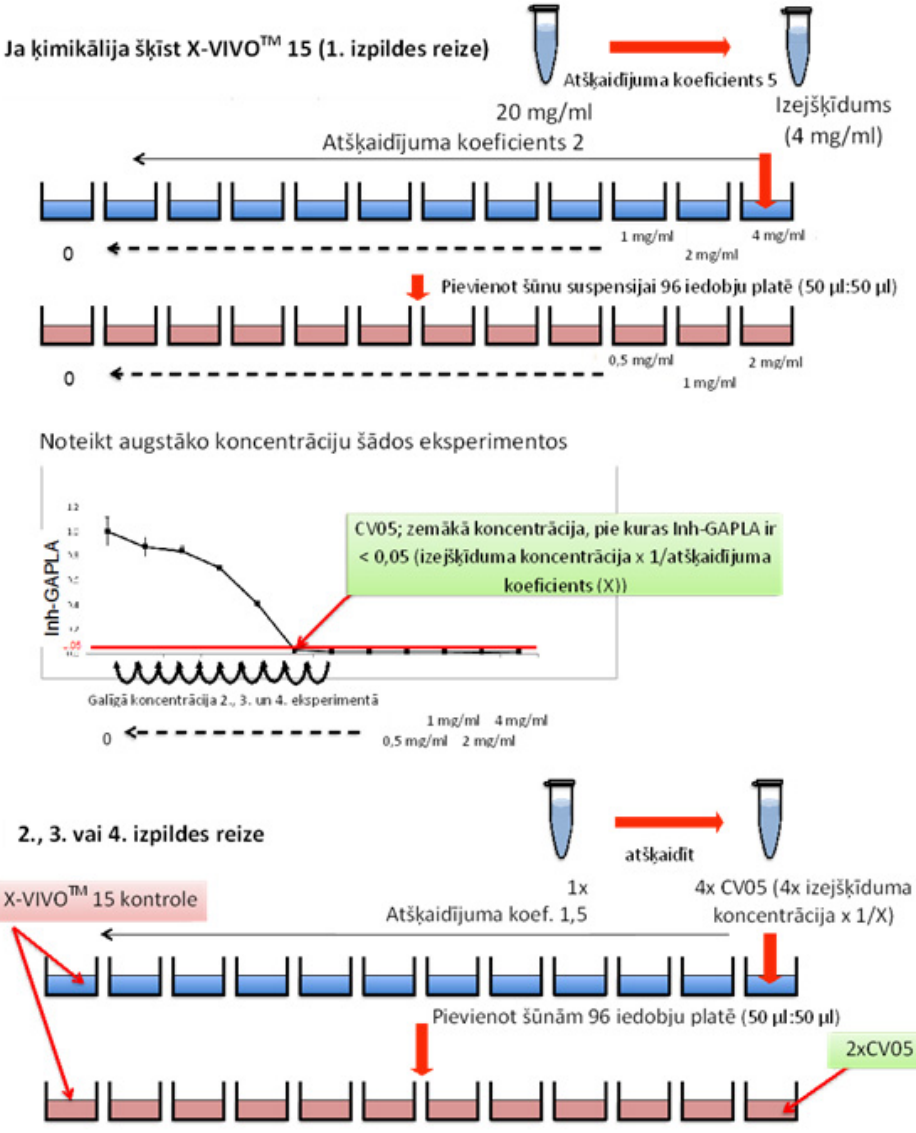
Tā kā *GAPLA* ir *nIL8LA* saucējs, ļoti maza vērtība izraisa lielas *nIL8LA* variācijas. Tāpēc var uzskatīt, ka, ja *Inh-GAPLA* vērtība ir ļoti maza (mazāka par 0,05), *Ind-IL8LA* vērtības ir neprecīzas.

▼**M8**

3.5. papildinājums

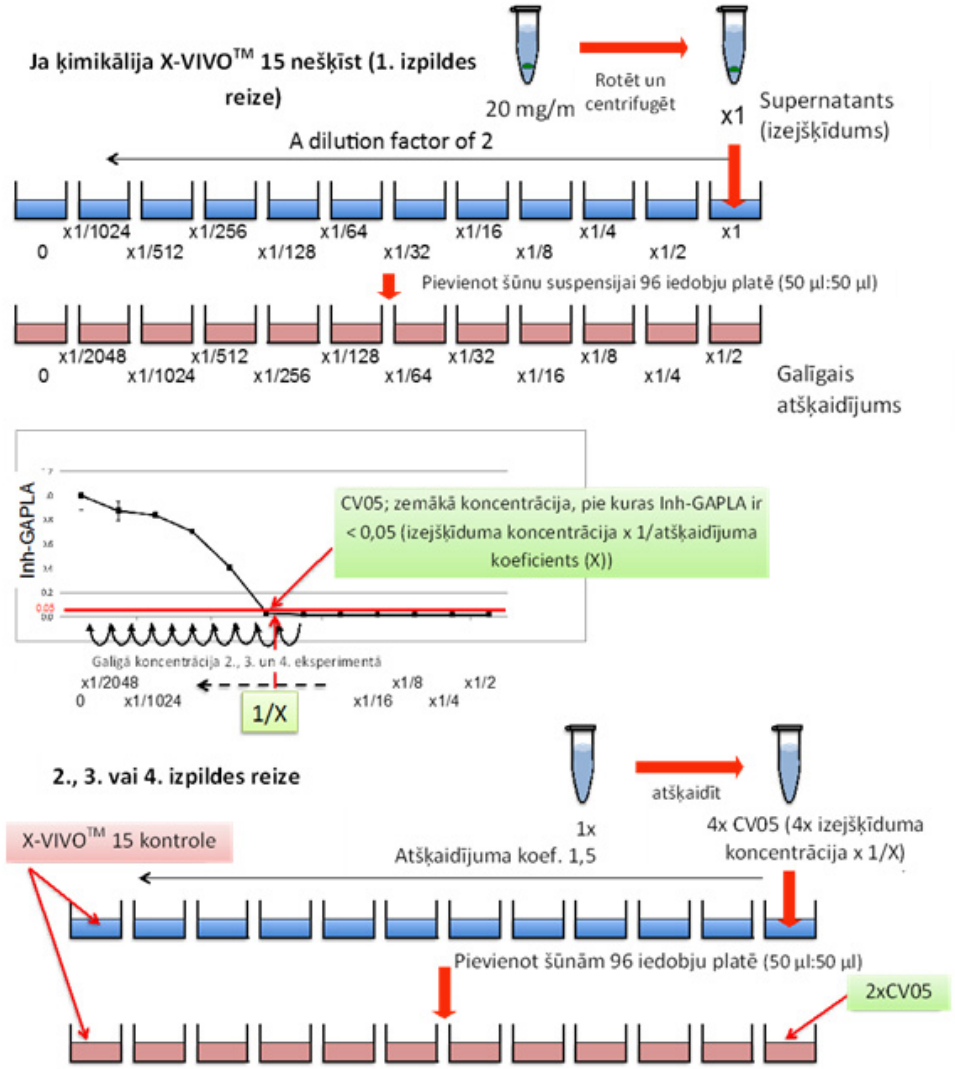
METODES, KĀ IZŠĶĪDINĀT ĶIMIKĀLIJAS TESTA IL-8 LUC VAJADZĪBĀM: SHĒMA

a) Ķimikālijas, kas *X-VIVO™ 15* šķīst koncentrācijā 20 mg/ml



▼**M8**

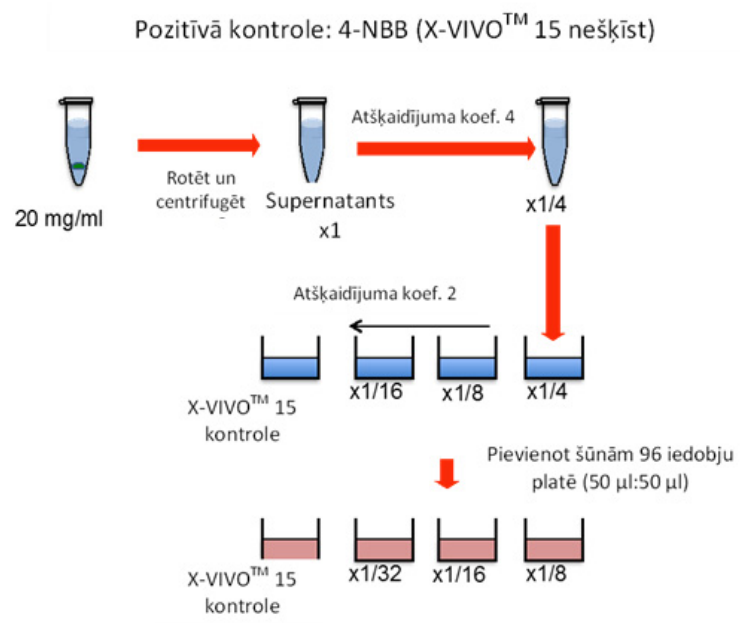
b) Kimikālijas, kas *X-VIVO*^{TM} *15* koncentrācijā 20 mg/ml neškīst



▼**M8**

3.6. papildinājums

METODE, KĀ IZŠĶĪDINĀT 4-NBB IZMANTOŠANAI PAR POZITĪVO KONTROLI TESTA IL-8 LUC VAJADZĪBĀM: SHĒMA



▼B

C DAĻA: METODES EKOTOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI

SATURS

C.1. AKŪTĀ TOKSICITĀTE ZIVĪM

C.2. AKŪTĀ TOKSICITĀTE DAFNIJĀM

C.3. SALDŪDENS AĻĢU UN CIĀNBAKTĒRIJU (ZILAĻĢU) AUGŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS

C.4. "VIEGLAS" BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJAS NOTEIKŠANA

I DAĻA. VISPĀRĪGI APSVĒRUMI

II DAĻA. IOO ATKRĀSOŠANĀS TESTS (C.4.-A metode)

III DAĻA. MODIFICĒTĀ ESAO SKRĪNINGA METODE (C.4.-B metode)

IV DAĻA. CO_2 IZDALĪŠANĀS TESTS (C.4.-C metode)

V DAĻA. MANOMETRISKĀ RESPIROMETRIJA (C.4.-D metode)

VI DAĻA. SLĒGTO PUDEĻU METODE (C.4.-E metode)

VII DAĻA. *MITI* METODE (C.4.-F metode)

C.5. DEGRADĀCIJA – BIOĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ

C.6. DEGRADĀCIJA – ĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ

C.7. NOĀRDĪŠANĀS – ABIOTISKA NOĀRDĪŠANĀS: HIDROLĪZE ATKARĪBĀ NO pH

C.8. TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA SLIEKĀM

C.9. BIODEGRADĀCIJA – CĀNA-VELLENA TESTS

C.10. AEROBĀS NOTEKŪDEŅU ATTĪRĪŠANAS IMITĀCIJAS TESTS. C.10.-A. AKTĪVO DŪŅU BLOKI – C.10.-B. BIOPLĒVES

C.11. AKTĪVO DŪŅU ELPOŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS (OGLEKĻA UN AMONIJA OKSIDĒŠANĀS)

C.12. BIODEGRADĀCIJA – MODIFICĒTS SCAS TESTS

C.13. BIOAKUMULĀCIJA ZIVJU ORGANISMĀ: ŪDENSEKSPOZĪCIJA UN UZTUREKSPOZĪCIJA

C.14. ZIVJU MAZUĻU AUGŠANAS TESTS

C.15. ĪSTERMIŅA TOKSICITĀTES TESTS ZIVĪM EMBRIJA UN DZELTENUMMAISA ATTĪSTĪBAS POSMOS

C.16. MĀJAS BITES – AKŪTAS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS

C.17. MĀJAS BITES – AKŪTAS KONTAKTA TOKSICITĀTES TESTS

C.18. ADSORBCIJA/DESORBCIJA AR KRATĪŠANAS METODI

▼B

C.19. ADSORBCIJAS KOEFICIENTA (K_{OC}) NOTEIKŠANA UZ AUGSNES UN UZ KANALIZĀCIJAS NOSĒDUMIEM AR AUGSTAS IZŠĶIRŠANAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJU (*HPLC*)

C.20. *DAPHNIA MAGNA* VAIROŠANĀS TESTS

C.21. AUGSNES MIKROORGANISMI – SLĀPEKĻA TRANSFORMĀCIJAS TESTS

C.22. AUGSNES MIKROORGANISMI – OGLEKĻA TRANSFORMĀCIJAS TESTS

C.23. AEROBĀ UN ANAEROBĀ TRANSFORMĀCIJA AUGSNĒ

C.24. AEROBĀ UN ANAEROBĀ TRANSFORMĀCIJA ŪDENS NOSĒDUMU SISTĒMĀS

C.25. AEROBĀ MINERALIZĀCIJA VIRSZEMES ŪDENĪ – BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS IMITĀCIJAS TESTS

C.26. ŪDENSZIEDU *(LEMNA)* SUGU AUGŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS

C.27. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTUS NOSĒDUMUS

C.28. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTU ŪDENI

C.29. VIEGLAS BIONOĀRDĪŠANĀS SPĒJA – CO_2 HERMĒTISKI NOSLĒGTOS TRAUKOS (BRĪVĀ TILPUMA TESTS)

C.30. BIOAKUMULĀCIJA SAUSZEMES MAZSARTĀRPOS (*OLIGOCHAETA*)

C.31. SAUSZEMES AUGU TESTS: DĪGSTU UZDĪGŠANAS UN DĪGSTU AUGŠANAS TESTS

C.32. SĪKSLIEKU VAIROŠANĀS TESTS

C.33. SLIEKU VAIROŠANĀS TESTS *(EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI)*

C.34. ANAEROBO BAKTĒRIJU AKTIVITĀTES INHIBĒŠANĀS NOTEIKŠANA PĒC TĀ, KĀ SAMAZINĀS GĀZES IZDALĪŠANĀS NO ANAEROBI BIONOĀRDOŠĀM (NOTEKŪDEŅU) DŪŅĀM

C.35. *LUMBRICULUS* TOKSICITĀTES TESTS SEDIMENTU-ŪDENS SISTĒMĀ AR PAPILDINĀTIEM SEDIMENTIEM

C.36. PLĒSĒJĒRCES *(HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER)* VAIROŠANĀS TESTS AUGSNĒ

C.37. ZIVJU 21 DIENAS TESTS: ESTROGĒNISKĀS UN ANDROGĒNISKĀS DARBĪBAS UN AROMATĀZES TRAUCĒJUMU ĪSAIS SKRĪNINGS

C.38. ABINIEKU METAMORFOZES TESTS

C.39. KOLEMBOLU VAIROŠANĀS TESTS AUGSNĒ

▼B

C.40. TRĪSUĻODU DZĪVES CIKLA SEDIMENTU-ŪDENS TOKSICITĀTES TESTS, IZMANTOJOT AR TESTĒJAMO VIELU PAPILDINĀTU ŪDENI VAI PAPILDINĀTUS SEDIMENTUS

C.41. ZIVJU DZIMUMATTĪSTĪBAS TESTS

C.42. BIONOĀRDĀMĪBA JŪRAS ŪDENĪ

C.43. ORGANISKO VIELU ANAEROBĀ BIONOĀRDĀMĪBA PĀRSTRĀDĀTĀS DŪŅĀS: SARAŽOTĀS GĀZES MĒRĪŠANA

C.44. IZSKALOŠANĀS AUGSNES KOLONNĀS

C.45. APLĒSE PAR EMISIJĀM VIDĒ NO KOKSNES, KAS APSTRĀDĀTA AR KONSERVANTIEM: LABORATORIJAS METODE SASKARĒ AR SALDŪDENI VAI JŪRAS ŪDENI ESOŠIEM KOKA IZSTRĀDĀJUMIEM BEZ PĀRKLĀJUMA

C.46. BIOAKUMULĀCIJA SEDIMENTOS DZĪVOJOŠOS BENTISKOS MAZSARTĀRPOS

C.47. ZIVJU AGRĪNO ATTĪSTĪBAS STADIJU TOKSISKUMA TESTS

C.48. ĪSAIS ZIVJU VAIROŠANĀS TESTS

C.49. ZIVJU EMBRIJU AKŪTĀ TOKSISKUMA (*FET*) TESTS

C.50. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* TOKSISKUMA BEZSEDIMENTU TESTS

C.51. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ŪDENS–SEDIMENTU TOKSISKUMA TESTS

C.52. PAPLAŠINĀTAIS VIENAS MEDAKU PAAUDZES REPRODUKCIJAS TESTS (*MEOGRT*)

C.53. ABINIEKU KĀPURU AUGŠANAS UN ATTĪSTĪBAS TESTS (*LAGDA*)

▼B

C.1. AKŪTĀ TOKSICITĀTE ZIVĪM

1. METODE

1.1. IEVADS

Šā testa nolūks ir noteikt vielas akūto letālo toksicitāti zivīm saldūdenī. Iespēju robežās ir jānodrošinās ar datiem par testa vielas šķīdību ūdenī, tvaika spiedienu, ķīmisko noturīgumu, disociācijas konstantēm un biosadalīšanos, kas var palīdzēt izvēlēties vispiemērotāko (statisko, pusstatisko vai caurplūdes) testa metodi un panākt pietiekami nemainīgu testa vielas koncentrāciju testu laikā.

Cita informācija (piemēram, struktūrformula, tīrības pakāpe, galveno piemaisījumu īpašības un procentuālais īpatsvars, piedevu daudzums un sadalījuma koeficients sistēmā n-oktanols/ūdens) jāņem vērā, plānojot testus un analizējot iegūtos rezultātus.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENVIENĪBAS

Akūtā toksicitāte ir redzamā kaitīgā ietekme, kas izraisīta organismā pēc vielas īslaicīgas (dažu dienu) iedarbības. Šajā testā akūtā toksicitāte ir izteikta kā vidējā letālā koncentrācija (LC_{50}), kas atbilst tādai vielas koncentrācijai ūdenī, kura norādītajā ilgstošas iedarbības laikā izraisa 50 % zivju nāvi testa grupā.

Visas testa vielas koncentrācijas ir izteiktas kā svars tilpuma vienībā (miligrami litrā). Tās var izteikt arī kā svaru uz svara vienību ($mg.kg^{-1}$).

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas izmantošana ļauj pārliecināties, ka pārbaudāmās sugas reakcija laboratorijas testa apstākļos nav būtiski mainījusies.

Šim testam standartvielas vēl nav noteiktas.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka LC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Uz zivīm 96 stundas iedarbojas ar testa vielu, kas pievienota ūdenim koncentrāciju diapazonā. Vismaz ik pēc 24 stundām reģistrē zivju mirstību un, ja iespējams, aprēķina koncentrāciju, kas izraisa 50 % zivju nāvi (LC_{50}) katrā novērošanas termiņā.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Kvalitātes kritērijus piemēro pieļaujamības testam, kā arī visai testa metodei.

Kontroles grupas mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 % (vai vienu zivi, ja izmanto mazāk par desmit zivīm).

Izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visu laiku jābūt lielākai par 60 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas.

▼B

Testa vielas koncentrācijas visā testa laikā saglabā 80 % robežās no sākuma koncentrācijas.

Vielām, kas viegli šķīst testa vidē, veidojot stabilus šķīdumus, t. i., tādus, kas nekādā jūtamā veidā neiztvaiko, nenoārdās, nehidrolizējas vai neadsorbējas, sākuma koncentrāciju var uzskatīt par vienādu ar nominālo koncentrāciju. Jāsniedz dati, ka koncentrācija ir saglabāta visā testa laikā un ka kvalitātes kritēriji ir izpildīti.

Vielām, kas:

i) slikti šķīst testa vidē;

ii) spēj veidot stabilas emulsijas vai dispersijas vai

iii) nav stabilas ūdens šķīdumos,

par sākuma koncentrāciju pieņem šķīdumā izmērīto koncentrāciju (vai, ja tas tehniski ir iespējams, ūdens kolonnā izmērīto koncentrāciju) testa sākumā. Koncentrāciju nosaka pēc līdzsvara sasniegšanas laika posma, bet pirms testa zivju ielaišanas.

Katrā no šiem gadījumiem testa laikā jāizdara turpmāki mērījumi, lai apstiprinātu faktiskās iedarbīgās koncentrācijas vai atbilstību kvalitātes kritērijiem.

pH nedrīkst atšķirties vairāk par 1 vienību.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

Var izmantot trīs dažādas procedūras.

Statiskais tests:

toksicitātes tests, kurā nav testa šķīduma plūsmas. (Šķīdumi paliek nemainīti visā testa laikā.)

Pusstatiskais tests:

testa laikā šķīduma plūsma netiek nodrošināta, bet ilgākā laika posmā (piemēram, pēc 24 stundām) testa šķīdumu periodiski apmaina.

Tests caurplūdes apstākļos:

toksicitāti nosaka testa kamerās, kurās pastāvīgi atjauno ūdeni, un testa vielu pievieno ūdenim, ar kuru atjauno testa vidi.

1.6.1. **Reaģenti**

1.6.1.1. *Testa vielu šķīdumi*

Vajadzīgās koncentrācijas izejas standartšķīdumus gatavo, izšķīdinot vielu dejonizētā ūdenī vai ūdenī, kas iegūts saskaņā ar 1.6.1.2. punktu.

Testam vajadzīgo koncentrāciju iegūst, atšķaidot izejas standartšķīdumu. Ja pārbauda lielāku koncentrāciju, vielu var izšķīdināt tieši ūdenī, ko lieto atšķaidīšanai.

▼B

Vielas parasti jāpārbauda tikai līdz šķīdības robežai. Attiecībā uz dažām vielām (piemēram, vielām, kam ir maza šķīdība ūdenī vai liels P_{ow}, vai tām, kas ūdenī veido drīzāk stabilu dispersiju nekā īstu šķīdumu) ir pieņemams testa koncentrāciju palielināt virs vielas šķīdības robežas, lai nodrošinātu, ka ir iegūta maksimālās šķīdības koncentrācija/maksimālā stabilā koncentrācija. Tomēr ir svarīgi, lai minētā koncentrācija citādi neizjauktu testa sistēmu (piemēram, vielas plēve uz ūdens virsmas, kas kavē ūdens piesātināšanu ar skābekli, utt.).

Kā palīglīdzekli ūdenī slikti šķīstošu vielu izejas standartšķīdumu pagatavošanai vai minēto vielu disperģēšanai testa vidē var izmantot dispersiju ar ultraskaņu, organiskos šķīdinātājus, emulgatorus vai disperģētājus. Ja izmanto tādas palīgvielas, visām testa koncentrācijām jāsatur viens un tas pats palīgvielas daudzums, un papildu kontroles zivs ir jāpakļauj tādai pašai palīgvielas koncentrācijai, kādu izmanto testa sērijā. Palīgvielu koncentrācijai jābūt iespējami mazai, un nekādā ziņā tā nedrīkst pārsniegt 100 mg litrā testa vides.

Tests jāveic bez pH korekcijas. Ja novēro krasas pH izmaiņas, testu ieteicams atkārtot, veicot pH korekciju, un rezultāti jāprotokolē. Šajā gadījumā izejas standartšķīduma pH koriģē līdz pH līmenim, kāds ir ūdenim, ko izmanto atšķaidīšanai, ja nav īpašu iemeslu rīkoties citādi. Šim nolūkam vēlams izmantot HCl un NaOH. pH līmenis jākoriģē tā, lai būtiski neietekmētu testa vielas koncentrāciju izejas standartšķīdumā. Ja šāda korekcija izraisa ķīmisku reakciju vai testa vielas nogulsnēšanos, tas jāreģistrē.

1.6.1.2. *Ūdens atšķaidīšanai un zivju turēšanai*

Var izmantot dzeramo ūdeni (kas nesatur hloru, smagos metālus vai citas nevēlamas vielas bīstamā koncentrācijā), labas kvalitātes dabīgo ūdeni vai "atjaunotu" ūdeni (skatīt 1. papildinājumu). Ieteicams izmantot ūdeni, kura kopējā cietība ir 10 līdz 250 mg/l (pēc $CaCO_3$) un pH līmenis 6,0–8,5.

1.6.2. **Aprīkojums**

Visam aprīkojumam jābūt no ķīmiski inerta materiāla.

— automātiskā atšķaidīšanas iekārta (caurplūdes testam),

— skābekļa mērītājs,

— iekārta ūdens cietības noteikšanai,

— piemērota temperatūras regulēšanas ierīce,

— pH metrs.

1.6.3. **Testa zivis**

Zivis nedrīkst būt slimas vai ar izteiktām kroplības pazīmēm.

▼B

Izmantojamā suga jāizvēlas, pamatojoties uz praktiskiem kritērijiem, tādiem kā viegla pieejamība visu gadu, turēšanas vieglums, ērtums testēšanai, relatīvā jutība pret ķīmiskām vielām un ekonomiskie, bioloģiskie vai ekoloģiskie faktori, kas uz to attiecas. Izvēloties zivju sugu, ir jāņem vērā arī iegūto datu salīdzināmība un esošā starptautiskā saskaņošana (1. atsauce).

Šā testa veikšanai ieteicamo zivju sugu saraksts ir norādīts 2. papildinājumā; ieteicamākās sugas ir *Danio* zebras zivs un varavīksnes forele.

1.6.3.1. *Turēšanas apstākļi*

Ieteicams izmantot līdzīga garuma un vecuma zivis no viena sūtījuma. Vismaz 12 dienas zivis tur šeit norādītajos apstākļos:

Zivju daudzums:

atkarībā no izmantotās sistēmas (recirkulācija vai caurplūde) un zivju sugas.

Ūdens:

skatīt 1.6.1.2. punktu.

Apgaismojums:

ikdienas apgaismojums 12 līdz 16 stundas.

Skābekļa koncentrācija ūdenī:

vismaz 80 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas.

Barošana:

trīsreiz nedēļā vai katru dienu, to pārtrauc 24 stundas pirms testa.

1.6.3.2. *Mirstība*

Beidzoties 48 stundu pierašanas laikam, reģistrē mirstību, ievērojot šādus kritērijus:

— lielāka par 10 % no populācijas septiņās dienās –

izbrāķē visu partiju,

— 5 līdz 10 % no populācijas –

turēšanas laiku turpina septiņas papildu dienas.

Ja turpmāk mirstības gadījumus nenovēro, partija der izmēģinājumiem, pretējā gadījumā to izbrāķē,

— mazāk par 5 % no populācijas –

partiju pieņem.

1.6.4. **Pielāgošanās**

Vismaz septiņas dienas pirms testa visas zivis jātur tādas pašas kvalitātes un temperatūras ūdenī, kādu izmantos pārbaudes laikā.

▼B

1.6.5. **Testa procedūra**

Pirms testa uzsākšanas var veikt priekšizmēģinājumu, lai noskaidrotu, kāds koncentrācijas diapazons būtu izmantojams testa laikā.

Papildus testa sērijai izdara vienu kontroles izmēģinājumu bez testa vielas un attiecīgā gadījumā vienu kontroles izmēģinājumu ar palīgvielu.

Atkarībā no testa vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām attiecīgi izvēlas statisko, pusstatisko vai caurplūdes modeli, lai atbilstu kvalitātes kritērijiem.

Zivis pakļauj vielas iedarbībai, ievērojot šādus nosacījumus:

— ilgums – 96 stundas,

— dzīvnieku skaits – vismaz septiņi uz katru vielas koncentrāciju,

— rezervuāri – kuru tilpums atbilst ieteiktajam zivju skaitam,

— zivju daudzums – maksimālais ieteicamais zivju daudzums statiskos un pusstatiskos testos ir 1g litrā; caurplūdes sistēmās ir pieņemams lielāks zivju daudzums,

— testa koncentrācija – vismaz piecas koncentrācijas, kas atšķiras ar nemainīgu koeficientu, ne lielāku par 2,2, un kas cik iespējams ietver diapazonu no 0 līdz 100 % mirstībai,

— ūdens – skatīt 1.6.1.2. punktu,

— apgaismojums – ikdienas apgaismojums 12 līdz 16 stundas,

— temperatūra – atkarībā no zivju sugas (2. papildinājums), bet kuras svārstības testa laikā nepārsniedz ±1 ^{o}C,

— skābekļa koncentrācija ūdenī – vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas izvēlētajā temperatūrā,

— barošana – nebaro.

Zivis pirmoreiz apskata pēc 2–4 stundām un vēlāk vismaz ik pēc 24 stundām. Uzskata, ka zivs ir nedzīva, ja, pieskaroties tās astei, tā neizrāda nekādu reakciju un elpošanas kustības. Pamanītas nedzīvas zivis izņem un reģistrē to nāvi. Reģistrē arī citas redzamas anomālijas (piemēram, līdzsvara zudumu, peldēšanas, elpošanas, pigmentācijas izmaiņas u. tml.).

Katru dienu veic pH, ūdenī izšķīdušā skābekļa un temperatūras mērījumus.

Pieļaujamības tests

Izmantojot šajā testa metodē aprakstītās procedūras, pieļaujamības testu var izdarīt ar koncentrāciju 100 mg litrā, lai parādītu, ka LC_{50} ir lielāks par minēto koncentrāciju.

Ja vielas īpašības ir tādas, ka koncentrāciju 100 mg litrā ūdens nevar iegūt, pieļaujamības tests jāveic pie koncentrācijas, kas ir vienāda ar vielas šķīdību (vai pie maksimālās koncentrācijas, kurā veidojas stabila dispersija) izmantotajā vidē (skatīt arī 1.6.1.1. punktu).

▼B

Pieļaujamības tests jāveic, izmantojot 7 līdz 10 zivis, ar tādu pašu kontroles zivju skaitu. (Binomiālā teorija nosaka, ka, izmantojot 10 zivis, pie nulles mirstības ir 99,9 % ticamība, ka LC_{50} ir lielāks par pieļaujamības testā izmantoto koncentrāciju. Izmantojot 7, 8 vai 9 zivis, nulles mirstība sniedz vismaz 99 % ticamību, ka LC_{50} ir lielāks par izmantoto koncentrāciju.)

Ja mirstība pastāv, ir jāizdara pilns pētījums. Ja ir novērotas subletālas ietekmes, tās ir jāreģistrē.

2. **DATI UN TO IZVĒRTĒŠANA**

Par katru laika posmu, kad ir reģistrēti novērojumi (24, 48, 72 un 96 stundas), mirstību, kas izteikta procentos katrā ieteicamajā iedarbības laika posmā, atliek pret koncentrāciju logaritmiskajā/varbūtības diagrammā.

Ja ir iespējams, izmantojot standarta procedūras, katram novērošanas laikam ir jānovērtē LC_{50} un ticamības robežas ($p = 0,05$); šie lielumi jānoapaļo līdz vienam vai, lielākais, līdz diviem nozīmīgiem cipariem (noapaļošanas līdz diviem cipariem piemēri: 173,5 noapaļo līdz 170; 0,127 noapaļo līdz 0,13; 1,21 noapaļo līdz 1,2).

Ja koncentrācijas/atbildes reakcijas procentu līkne ir pārāk stāva, lai aprēķinātu LC_{50} vērtību, pietiek ar tās grafiski iegūto aptuveno vērtību.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kas viena no otras atšķiras 2,2 reizes, izraisa tikai 0 un 100 % mirstību, ar to pietiek, lai norādītu diapazonu, kurā ietilpst LC_{50}.

Ja ir novērots, ka nevar nodrošināt testa vielas stabilitāti vai viendabīgumu, tas jāreģistrē un jāievēro piesardzība, interpretējot rezultātus.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šāda informācija:

— dati par testa zivīm (zinātniskais nosaukums, līnija, piegādātājs, pirmapstrāde, izmēri un skaits katrai testa koncentrācijai),

— norāde, kur ņem ūdeni atšķaidīšanai, un tā galvenās ķīmiskās īpašības (pH, cietība, temperatūra),

— ja viela slikti šķīst ūdenī, izejas standartšķīduma un testā izmantoto šķīdumu sagatavošanas paņēmiens,

— palīgvielu koncentrācija,

— izmantoto koncentrāciju saraksts un jebkuri pieejamie dati par testa vielas stabilitāti pārbaudāmajā koncentrācijā,

— ja veic ķīmiskās analīzes, izmantotās metodes un rezultāti,

— pieļaujamības testa rezultāti, ja tāds izdarīts,

— izvēlētās testa procedūras pamatojums un apraksts (piemēram, statiskā vai pusstatiskā metode, dozēšanas ātrums, caurplūdes ātrums, aerācijas nodrošinājums, zivju daudzums utt.),

▼B

— aprīkojuma apraksts,

— apgaismojuma režīms,

— skābekļa koncentrācija ūdenī, testā izmantoto šķīdumu pH vērtība un temperatūra ik pēc 24 stundām,

— kvalitātes kritēriju izpildes pierādījums,

— tabula, kurā parādīta kumulatīvā mirstība katrā koncentrācijā un kontroles grupā (un kontroles grupā ar palīgvielu, ja tā vajadzīga) katrā no ieteiktajiem novērošanas laikiem,

— testa beigās iegūtās koncentrācijas/atbildes reakcijas līknes grafiskais attēls,

— LC_{50} katrā ieteiktajā novērošanas termiņā (norādot 95 % ticamības robežas), ja iespējams,

— statistikas metodes LC_{50} noteikšanai,

— rezultāti, kas iegūti ar standartvielu, ja tādu izmanto,

— lielākā testa koncentrācija, kas neizraisa mirstību testa laikā,

— mazākā testa koncentrācija, kas izraisa 100 % mirstību testa laikā.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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 7346/1,/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 (11) und 1 (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 ecotoxicityof 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.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96, p. 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, p. 793–821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, Vol. 4, p. 3–32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.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. papildinājums

Atjaunotais ūdens

Atšķaidīšanai piemērots ūdens (paraugs)

Visām ķīmiskajām vielām jābūt analītiski tīrām.

Jāizmanto ļoti kvalitatīvs vai dejonizēts ūdens, kura vadītspēja ir zemāka par 5 μScm^{-1}.

Ūdens destilācija aparāts nedrīkst saturēt vara detaļas.

Pamatšķīdumi

$CaCI_2$. $2H_2O$ (kalcija hlorīda dihidrāts): 11,76 g

izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (magnija sulfāta heptahidrāts): 4,93 g

izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.

$NaHCO_3$ (nātrija hidrogēnkarbonāts): 2,59 g

izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.

KCl (kālija hlorīds): 0,23 g

izšķīdina ūdenī, lai kopējais tilpums būtu 1 litrs.

Atjaunotais ūdens atšķaidīšanai

No visiem četriem izejas standartšķīdumiem ņem pa 25 ml, sajauc kopā un pievieno ūdeni līdz 1 litram.

Veic aerāciju, līdz skābekļa koncentrācija ūdenī sasniedz gaisa piesātinājuma līmeni.

pH līmenim jābūt 7,8 ± 0,2.

Vajadzības gadījumā pH līmeni koriģē ar NaOH (nātrija hidroksīds) vai HCI (sālsskābe).

Šādi iegūto ūdeni atšķaidīšanai atstāj apmēram uz 12 stundām, aerācija vairs nav vajadzīga.

Kopējā Ca un Mg jonu koncentrācija šķīdumā ir 2,5 mmol litrā. Ca:Mg jonu attiecība ir 4:1, un Na:K jonu attiecība ir 10:1. Šā šķīduma kopējā sārmainība ir 0,8 mmol litrā.

Gatavojot ūdeni atšķaidīšanai, atkāpes no metodikas ir pieļaujamas, ja tās neietekmē ūdens sastāvu vai īpašības.

▼B

2. papildinājums

Ieteicamās zivju sugas

Ieteicamās sugas	Ieteicamais temperatūru diapazons (°C)	Ieteicamais kopējais testa dzīvnieka garums (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (*Hamilton-Buchanan*) Danio zebras zivs	20 līdz 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (*Rafinesque*) melnā platgalve	20 līdz 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (*Linneaus 1758*) parastā karpa	20 līdz 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (*Teleostei, Poeciliidae*) *Cyprinodontidae* (*Tomminck and Schlege 1850*) Japānas orīzija	20 līdz 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (*Peters 1859*) gupija	20 līdz 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei, Centrarchidae*) (*Rafinesque Linneaus 1758*) zilais saulesasaris	20 līdz 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (*Teleostei, Salmonidae*) (*Walbaum 1988*) varavīksnes forele	12 līdz 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (*Teleostei, Cyprinidae*) (*Linneaus 1758*) ālants, šķaunacis	20 līdz 24	6,0 ± 2,0

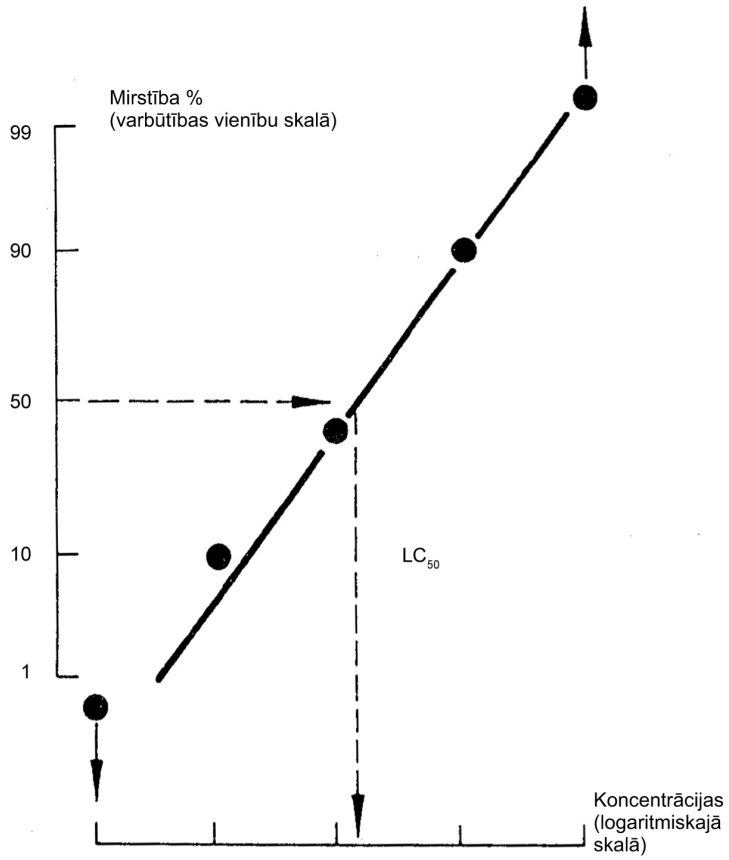
Zivju iegūšana

Iepriekš minētās zivis ir viegli audzējamas un plaši pieejamas visu gadu. Tās var pavairot un audzēt zivjaudzētavās vai laboratorijās, kas ļauj tās pasargāt no slimībām un parazītiem, tādējādi iegūstot veselas zivis, kuru izcelsme ir zināma. Šīs zivis pieejamas daudzās pasaules vietās.

▼B

3. papildinājums

Koncentrācijas piemērs – mirstības procentuālais īpatsvars



▼B

C.2. AKŪTĀ TOKSICITĀTE DAFNIJĀM

1. METODE

Akūtas imobilizācijas testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO TG 202 (2004) metodei.

1.1. IEVADS

Šajā metodē noteikts akūtās toksicitātes tests ķīmisko vielu iedarbības novērtēšanai uz dafnijām. Iespēju robežās izmantotas esošās metodes (1) (2) (3).

1.2. DEFINĪCIJAS

Šīs metodes kontekstā izmantoti šādi termini:

EC_{50}: koncentrācija, kurā noteiktā ekspozīcijas laikā tiek imobilizēti 50 % dafniju. Ja tiek izmantota cita definīcija, tā jānorāda kopā ar attiecīgo atsauci.

Imobilizācija: par imobilizētām tiek uzskatītas dafnijas, kas 15 sekundes pēc testēšanas trauka satura uzmanīgas samaisīšanas nespēj peldēt (pat ja tās vēl kustina viciņas).

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Jaunas dafnijas, kuru vecums nepārsniedz 24 stundas testēšanas sākumā, 48 stundu laikā pakļauj testējamās vielas dažādu koncentrāciju iedarbībai. Imobilizāciju nosaka pēc 24 un 48 stundām, salīdzinot ar kontroli. Rezultātus analizē, lai aprēķinātu EC_{50} pēc 48 stundām (skatīt 1.2. punktā minētās definīcijas). EC_{50} noteikšanu pēc 24 stundām veic pēc izvēles.

1.4. INFORMĀCIJA PAR TESTA VIELU

Jābūt zināmai testējamās vielas šķīdībai ūdenī un tvaika spiedienam, un drošai testējamo šķīdumu analīzes metodei vielas daudzuma noteikšanai ar zināmu atgūstamību un kvantitatīvās noteikšanas robežu. Lietderīga ir informācija par vielas struktūru, tīrības pakāpi, stabilitāti ūdenī un gaismā, P_{ow} un vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas testēšanas rezultātiem (skatīt metodi C.4).

Piezīme: norādījumi par vielu testēšanu gadījumos, kad šo vielu fizikāli ķīmisko īpašību dēļ testēšana ir sarežģīta, atrodami (4).

1.5. STANDARTVIELAS

Standartvielu EC_{50} testēšanu var izmantot par līdzekli testēšanas apstākļu piemērotības apstiprināšanai. Šim nolūkam ieteicams lietot toksiskās vielas, kas tika vairākkārt izmantotas starptautiskās salīdzināšanas testēšanā ([1]) (1) (5). Standartvielas testēšanu ieteicams veikt vismaz reizi mēnesī vai vismaz divas reizes gadā.

([1]) Saskaņā ar šo starplaboratoriju salīdzināšanas testu rezultātiem un standarta ISO 6341 Tehnisko labojumu, kālija bihromātam ($K_2Cr_2O_7$) noteiktā EC_{50} vērtība pēc 24 stundām ir no 0,6 mg/l līdz 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Lai testa rezultāti būtu derīgi, jāievēro šādi kritēriji:

— kontrolēs, ieskaitot kontroli ar solubilizācijas aģentu, ne vairāk kā 10 % no dafnijām jābūt imobilizētām,

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai testa beigās jābūt ≥ 3 mg/l kontroles un testa traukos.

Piezīme: pirmajam kritērijam ne vairāk kā 10 % no kontroles dafnijām jābūt novērojamai imobilizācijai vai citām slimību un stresa pazīmēm, piemēram, krāsas zaudēšanai un tādai neparastai uzvedībai kā aizturēšanās uz ūdens virsmas.

1.7. TESTA METODES APRAKSTS

1.7.1. **Aprīkojums**

Testēšanas traukiem un citai aparatūrai, kas nonāk saskarē ar testējamajiem šķīdumiem, jābūt izgatavotiem no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Parasti testēšanai izmanto stikla mēģenes un vārglāzes; pirms katras lietošanas testēšanas trauki jāmazgā saskaņā ar laboratorijas standartprocedūrām. Testēšanas trauki jānosedz, lai samazinātu ūdens zudumus iztvaikošanas dēļ, un jānovērš putekļu iekļūšana šķīdumos. Gaistošas vielas jātestē pilnīgi piepildītos noslēgtos traukos, un tiem jābūt pietiekami lieliem, lai novērstu iespēju, ka ir par maz skābekļa vai tas kļūst par ierobežojošo faktoru (skatīt 1.6. punktu un 1.8.3. punkta pirmo daļu).

Papildus izmanto šādas iekārtas: oksimetru (ar mikroelektrodu vai citu ierīci, kas piemērota izšķīdušā skābekļa mērīšanai maza apjoma paraugos); pH-metru; piemērotu temperatūras regulēšanas ierīcu; iekārtu kopējā organiskā oglekļa koncentrācijas (TOC) noteikšanai; iekārtu ķīmiskā skābekļa patēriņa (ĶSP – *COD*) noteikšanai, iekārtu cietības noteikšanai u. c.

1.7.2. **Testa organismi**

Priekšroka dodama dafniju sugai *Daphnia magna* Straus, tomēr šim testam var izmantot citas piemērotas *Daphnia* sugas (piemēram, *Daphnia pulex*). Testa sākumā dzīvnieku vecumam jābūt mazākam par 24 stundām, bet rezultātu izkliedes samazināšanai noteikti ieteicams, lai tie nebūtu pirmās paaudzes pēcnācēji. To izcelsmei jābūt no veselīgas populācijas (t. i., nav pieļaujamas tādas stresa pazīmes kā liela mirstība, tēviņu un efipiju klātbūtne, pirmās paaudzes producēšanas kavējums, krāsu zaudējuši dzīvnieki u. c.). Visu konkrētam testam izmantoto organismu izcelsmei jābūt no kultūrām, kas iegūtas no vienas dafniju rezerves kultūras. Dzīvnieku rezerves kultūra jāuztur tādos apstākļos (gaisma, temperatūra, barotne), kas līdzīgi testēšanas apstākļiem. Ja dafniju kultūras barotne, kas paredzēta izmantošanai testēšanā, atšķiras no barotnes, kas izmantota rutīnas dafniju kultūrai, būtu ieteicams pirms testēšanas paredzēt aklimatizācijas periodu. Šajā nolūkā dafnijas jāiztur atšķaidīšanai izmantojamajā ūdenī testēšanas temperatūrā vismaz 48 stundas pirms testēšanas sākuma.

▼B

1.7.3. **Ūdens atšķaidīšanai un zivju turēšanai**

Dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens vai ūdensvada ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams turēšanai un atšķaidīšanai, ja dafnijas tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas, aklimatizācijas un testēšanas laikā. Jebkurš ūdens, kas atbilst atšķaidīšanas ūdenim 1. papildinājumā noteiktajiem ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots testēšanai. Šim ūdenim jābūt pastāvīgai kvalitātei testēšanas laikā. Rekonstituētu ūdeni var sagatavot, pievienojot noteiktos atzītas analītiskās tīrības klases reaģentu daudzumus dejonizētam vai destilētam ūdenim. Rekonstituēta ūdens piemēri ir minēti (1) (6) un 2. papildinājumā. Jāņem vērā, ka barotnes, kas satur helātveidotājus, piemēram, 2. papildinājumā minētās M4 un M7 barotnes, nav piemērotas metālus saturošu vielu testēšanai. Vides reakcijai pH jābūt diapazonā no 6 līdz 9. Cietība no 140 un 250 mg/l (izsakot $CaCO_3$) ir ieteicama, izmantojot *Daphnia magna*, zemāka cietība var būt piemērota arī citām *Daphnia* sugām. Atšķaidīšanas ūdeni var aerēt pirms izmantošanas testēšanai tā, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija atbilstu piesātinājuma stāvoklim.

Ja lieto dabīgu ūdeni, kvalitātes parametrs jāmēra vismaz divas reizes gadā vai katru reizi, kad ir aizdomas, ka kvalitātes rādītāji ir ievērojami mainīgi (skatīt iepriekšējo daļu un 1. papildinājumu). Jānosaka arī smagie metāli (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ja izmanto ūdensvada ūdeni, no kura attīrīts hlors, vēlams katru dienu veikt hlora analīzi. Ja atšķaidīšanas ūdens ir virszemes ūdens vai gruntsūdens, jāmēra tā vadītspēja un jānosaka kopējais organiskā oglekļa saturs (*TOC*), vai ķīmiskais skābekļa patēriņš (ĶSP).

1.7.4. **Testējamie šķīdumi**

Vajadzīgās koncentrācijas testējamos šķīdumus parasti pagatavo, atšķaidot rezerves šķīdumu. Rezerves šķīdumus ieteicams gatavot, izšķīdinot testējamo vielu atšķaidīšanai paredzētajā ūdenī. Ciktāl tas iespējams, jāizvairās no šķīdinātāju, emulgatoru vai disperģētāju pielietošanas. Tomēr noteiktos gadījumos šīs vielas var izrādīties nepieciešamas, lai iegūtu attiecīgas koncentrācijas rezerves šķīdumu. Norādījumi par piemērotiem šķīdinātājiem, emulgatoriem un disperģētājiem ir minēti (4). Testējamās vielas daudzums testējamos šķīdumos nedrīkst pārsniegt šķīdības robežu atšķaidīšanas ūdenī.

Tests jāveic bez pH korekcijas. Ja pH nepaliek 6–9 diapazonā, tad jāveic vēl viens tests, rezerves šķīduma pH koriģējot līdz atšķaidīšanas ūdens reakcijas līmenim pirms testējamās vielas pievienošanas. pH koriģēšana jāveic tādā veidā, lai ievērojami nemainītos rezerves šķīduma koncentrācija un lai nenotiktu nekādas ķīmiskās reakcijas ar testējamo vielu, vai lai tā neizgulsnētos. Korekcijai vēlams izmantot HCl un NaOH.

▼B

1.8. PROCEDŪRA

1.8.1. **Ekspozīcijas apstākļi**

1.8.1.1. *Testa grupas un kontroles*

Testēšanas traukos iepilda attiecīgos atšķaidīšanas ūdens un testējamās vielas šķīdumu daudzumus. Gaisa/ūdens attiecībai traukā testējamajā un kontroles grupā jābūt vienādai. Pēc tam testēšanas traukos ievieto dafnijas. Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei jāizmanto vismaz 20 dafnijas, kuras ieteicams iedalīt četrās grupās pa pieciem īpatņiem katrā. Katrai dafnijai jāparedz vismaz 2 ml testējamā šķīduma (t. i., 10 ml piecām dafnijām katrā testēšanas traukā). Testu var veikt, izmantojot pusstatisko atjaunošanu vai caurplūdes sistēmu, ja testējamās vielas koncentrācija nav stabila.

Papildus apstrādājamai sērijai jābūt vienai atšķaidāmā ūdens kontroles sērijai, kā arī, ja tas piemērojams, vienai kontroles sērijai ar solubilizācijas aģentu.

1.8.1.2. *Testējamās koncentrācijas*

Var veikt diapazona noteikšanas testu, lai noteiktu pašam testam paredzēto koncentrācijas diapazonu, ja nav informācijas par testējamās vielas toksicitāti. Šajā nolūkā dafnijas pakļauj ievērojami atšķirīgu testējamās vielas koncentrāciju iedarbībai. Piecas dafnijas pakļauj katras testējamās koncentrācijas iedarbībai 48 stundas vai mazāk, turklāt nav nepieciešami atkārtojumi. Iedarbības laiku var saīsināt (piemēram, līdz 24 stundām vai mazāk), ja diapazona noteikšanas testam paredzētos datus var iegūt īsākā laikā.

Jāizmanto vismaz piecas testējamās koncentrācijas. Koncentrācijām jāmainās ģeometriskā progresijā ar koeficientu, kas, vēlams, nepārsniedz 2,2. Jāsniedz pamatojums, ja izmanto mazāk nekā piecas koncentrācijas. Lielākās testa koncentrācijas rezultātam jābūt 100 % imobilizācijai, bet zemākās testa koncentrācijas rezultātam vajadzētu būt jebkādas novērojamas iedarbības trūkumam.

1.8.1.3. *Inkubācijas apstākļi*

Temperatūrai jābūt no 18 °C līdz 22 °C, un katrā atsevišķā testā tai jābūt nemainīgai ± 1 °C robežās. Ieteicams izmantot ciklu, kurā 16 stundas pavada ar apgaismojumu un 8 stundas tumsā. Testēšanu var veikt arī pilnīgā tumsā, īpaši gaismā nestabilām vielām.

Testēšanas laikā testēšanas traukos jānodrošina aerācija. Testu veic, nekoriģējot pH. Testēšanas laikā dafnijas nav jābaro.

1.8.1.4. *Ilgums*

Testēšanas ilgums ir 48 stundas.

1.8.2. **Novērojumi**

Katrs testēšanas trauks jāpārbauda, lai konstatētu imobilizētas dafnijas 24 un 48 stundas pēc testēšanas sākuma (definīciju skatīt 1.2. punktā). Bez imobilitātes jāfiksē arī uzvedības vai izskata anomālijas.

▼B

1.8.3. **Analītiskie mērījumi**

Izšķīdušo skābekli un pH mēra testēšanas sākumā un beigās kontroles variantā un pie lielākās testējamās vielas koncentrācijas. Kontrolē esošajai izšķīdinātā skābekļa koncentrācijai jāatbilst pieņemamības kritērijam (skatīt 1.6. punktu). Parasti pH nemainās vairāk par 1,5 vienībām. Temperatūru parasti mēra kontroles traukos vai telpā; temperatūra jāreģistrē visā testēšanas laikā vai vismaz testa sākumā un beigās.

Testējamās vielas koncentrāciju ieteicams mērīt vismaz lielākajai un mazākajai testa koncentrācijai testa sākumā un beigās (4). Rezultātiem ieteicams izmantot izmērītās koncentrācijas. Tomēr, ja ir liecības, ka visā testēšanas laikā testējamās vielas koncentrācija visumā atbilst nominālajai vai izmērītajai sākotnējai koncentrācijai ± 20 %, rezultātiem var izmantot nominālās vai izmērītās sākotnējās vērtības.

1.9. LIMITA TESTS

Izmantojot šajā metodē aprakstītās procedūras, varētu veikt limita testu pie 100 mg/l testējamās vielas vai līdz tās šķīdībai testējamajā šķīdumā (atkarībā no tā, kura no minētajām koncentrācijām ir zemāka), lai pierādītu, vai EC_{50} ir lielāka par šo koncentrāciju. Limita testu ieteicams veikt, izmantojot 20 dafnijas (tās ieteicams iedalīt četrās grupās pa pieciem īpatņiem) ar tādu pašu kontroļu skaitu. Ja notiek imobilizācija, jāveic testēšana pilnā apmērā. Jebkāda anomāla uzvedība jāreģistrē.

2. **DATI**

Dati jāapkopo tabulā, katram izmēģinājuma variantam un kontrolei norādot izmantoto dafniju skaitu un katrā atkārtojumā novēroto imobilizāciju. Procentos izteiktu imobilizēto dafniju skaitu, kas konstatēts pēc 24 un 48 stundām, attēlo grafiski atkarībā no testējamās vielas koncentrācijas. Datus analizē ar piemērotām statistikas metodēm (piemēram, probitu analīze, u. c.), lai aprēķinātu līkņu virziena koeficientus un EC_{50} ar 95 % ticamību ($p = 0,05$) (7) (8).

Ja EC_{50} aprēķināšanas standartmetodes iegūto datu apstrādei nav piemērojamas, augstākā koncentrācija, kas neizraisa nekādu imobilizāciju, un zemākā koncentrācija, pie kuras notiek 100 % imobilizācija, jāizmanto EC_{50} (par kuru pieņem šo divu koncentrāciju vidējo ģeometrisko vērtību) aptuvenai noteikšanai.

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj vismaz šāda informācija.

Testējamā viela:

— fiziskais sastāvs un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības,

▼B

— ķīmiskās identifikācijas dati, ieskaitot tīrības pakāpi.

Testa suga:

— *Daphnia* avots un suga, avota piegādātājs (ja zināms) un pielietotie kultūras apstākļi (ieskaitot barības avotu, veidu un daudzumu, barošanas biežumu).

Testēšanas apstākļi:

— testēšanas trauku apraksts: trauku tips, šķīduma tilpums, dafniju skaits vienā testēšanas traukā, katras koncentrācijas testēšanas trauku (atkārtojumu) skaits,

— rezerves šķīduma un testējamo šķīdumu sagatavošanas metodes, ieskaitot iespējamu šķīdinātāja vai disperģētāja lietošanu, testēšanai izmantotās koncentrācijas,

— informācija par atšķaidīšanas ūdeni: ūdens avots un kvalitātes rādītāji (pH, cietība, Ca/Mg attiecība, Na/K attiecība, bāziskums, vadītspēja u. c.); rekonstituētā ūdens sastāvs, ja izmanto šādu ūdeni,

— inkubācijas apstākļi: temperatūra, gaismas intensitāte un apgaismošanas periodiskums, izšķīdušā skābekļa saturs, pH u. c.

Rezultāti:

— to dafniju skaits un daļa procentos, kuras tika imobilizētas vai izrādīja jebkādus nelabvēlīgus efektus (ieskaitot anomālu uzvedību), kontrolē un visos variantos katrā novērojuma laikā, kā arī novēroto efektu būtības apraksts,

— ar standartvielu veiktās testēšanas rezultāti un datums, ja tiek veikta,

— nominālās testējamās koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, nosakot testējamās vielas koncentrāciju testēšanas traukos; jānorāda arī metodes atgūstamība un kvantitatīvās noteikšanas robeža,

— visi testēšanas laikā veiktie fizikālie un ķīmiskie temperatūras, pH un izšķīdušā skābekļa mērījumu rezultāti,

— EC_{50} pēc 48 h imobilizācijai ar ticamības intervāliem un modeļu grafikiem, kas tika izmantoti to aprēķinam, devas atbildes reakcijas līkņu virziena koeficients un standartnovirze; statistiskās procedūras, kas izmantotas EC_{50} noteikšanai (jānorāda arī šie dati, kas iegūti pēc 24 stundām, ja tie tika mērīti),

— paskaidrojums par jebkādu atkāpi no testēšanas metodes un par to, vai atkāpe ir ietekmējusi testa rezultātus.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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. p. 65–84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

1. PAPILDINĀJUMS

DAŽI ATŠĶAIDĪŠANAI PIEMĒROTA ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI

Viela	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikušais hlors	< 10 µg/l
Fosfororganisko pesticīdu kop. saturs	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polhlorbifenīlu kop. saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskā hlora saturs	< 25 ng/l

▼B

2. PAPILDINĀJUMS

PIEMĒROTA REKONSTITUĒTĀ TESTĒŠANAS ŪDENS PIEMĒRI

ISO testa ūdens (1)

Rezerves šķīdumi (atsevišķu vielu)		Gatavojot rekonstituēto ūdeni, 1 l ūdens jāpievieno šāds rezerves šķīdumu tilpums (*)
Viela	Daudzums, kas pievienots 1 l ūdens (*)	
Kalcija hlorīds $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnija sulfāts $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Nātrija bikarbonāts $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kālija hlorīds KCl	0,23 g	25 ml

(*) Piemērotas tīrības ūdens, piemēram, dejonizēts, destilēts vai ar apgriezto osmozi iegūtā ūdenī, kura vēlamā vadītspēja nepārsniedz 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendta M7 un M4 barotne

Aklimatizācija Elendta M7 un M4 barotnē

Dažām laboratorijām bija grūtības, dafnijas pārnesot tieši M4 un M7 barotnē. Tomēr zināmā mērā sekmīga var būt pakāpeniska aklimatizācija, t. i., pārnesot no dabīgās vides vispirms 30 %, pēc tam 60 % un visbeidzot 100 % Elendta barotnē. Aklimatizācija var ilgt līdz pat vienam mēnesim.

Sagatavošana

Mikroelementi

Vispirms piemērotas tīrības ūdenī, t. i., dejonizētā, destilētā vai ar apgriezto osmozi iegūtā ūdenī pagatavo atsevišķu pēdu elementu atsevišķus izejas šķīdumus (I). No šiem dažādajiem izejas šķīdumiem (I) pagatavo vienu izejas šķīdumu (II), kas satur visus pēdu elementus (apvienoto šķīdumu), t. i.:

Rezerves šķīdums(I) (atsevišķu vielu šķīdums)	Daudzums, kas pievienots ūdenim (mg/l)	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Lai pagatavotu apvienoto izejas šķīdumu II, ūdenim pievieno šādu daudzumu izejas šķīduma I (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 reizes	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 reizes	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 reizes	1,0	0,25

▼B

Rezerves šķīdums(I) (atsevišķu vielu šķīdums)	Daudzums, kas pievienots ūdenim (mg/l)	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Lai pagatavotu apvienoto izejas šķīdumu II, ūdenim pievieno šādu daudzumu izejas šķīduma I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 reizes	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6H_2OSrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 reizes	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 reizes	1,0	0,25
$_4 \cdot Na_2\ MoO_4 \cdot 2H_2OMoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 reizes	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2H_2OCuCl_2.2H_2O$	335	20 000 reizes	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 reizes	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 reizes	1,0	1,0
KI	65	20 000 reizes	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000 reizes	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000 reizes	1,0	1,0
Na_2 EDTA· $2H_2OED\text{-}_2$ OEDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 reizes	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2OFeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 reizes	—	—

Na 2 EDTA un $FeSO_4$ šķīdumus pagatavo atsevišķi, apvieno un tūlīt ievieto autoklāvā.

Tā iegūst:

2 l Fe-EDTA šķīdums		1 000	20,0	5,0

M4 un M7 barotnes

M4 un M7 vidi pagatavo, izmantojot rezerves šķīdumu II, barības makroelementus un vitamīnus, šādi:

	Ūdenim pievienotais daudzums (mg/l)	Koncentrācija (attiecībā pret M4 vidi)	Rezerves šķīduma II daudzums, kas pievienots, gatavojot barotni (ml/l)	
			M4	M7
Rezerves šķīdums II (mikroelementu maisījums)		20 reizes	50	50
Barības makroelementu rezerves šķīdumi (atsevišķas vielas)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000 reizes	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 reizes	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 reizes	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 reizes	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 reizes	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 reizes	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000 reizes	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 reizes	0,1	0,1

▼B

	Ūdenim pievienotais daudzums (mg/l)	Koncentrācija (attiecībā pret M4 vidi)	Rezerves šķīduma II daudzums, kas pievienots, gatavojot barotni (ml/l)	
			M4	M7
Kombinētais vitamīnu pamatšķīdums	—	10 000 reizes	0,1	0,1
Vitamīnu maisījuma rezerves šķīdumu gatavo, pievienojot šādus trīs veidu vitamīnus 1 l ūdens:				
Tiamīna hidrohlorīds	750	10 000		
Ciānkobalamīns (B_{12})	10	10 000		
Biotīns	7,5	10 000		

Vitamīnu maisījuma rezerves šķīdumu glabā sasaldētu mazās alikvotās. Vitamīnus barotnei pievieno neilgi pirms izmantošanas.

N. B.: Lai novērstu sāļu izgulsnēšanos, gatavojot barotni, rezerves šķīdumu alikvotas jāpievieno pie aptuveni 500–800 ml dejonizēta ūdens un pēc tam jāatšķaida līdz 1 litram.

N. B.: Pirmā publikācija par M4 barotni ir: *Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, p. 25–33.*

▼M6

C.3. SALDŪDENS AĻĢU UN CIĀNBAKTĒRIJU (ZILAĻĢU) AUGŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 201 (2006. gads, pielikums labots 2011. gadā). Ir konstatēta nepieciešamība papildināt testēšanas metodi, iekļaujot papildu sugas un atjauninot to, lai izpildītu prasības attiecībā uz ķīmisko vielu bīstamības novērtējumu un klasifikāciju. Minētā dokumenta pārskatīšana ir veikta, pamatojoties uz plašo praktisko pieredzi, zinātnes attīstību attiecībā uz vielu toksisko ietekmi uz aļģēm, un plašu izmantošanu reglamentējošo noteikumu izstrādē, kas notikusi laikposmā kopš sākotnējās versijas pieņemšanas.

2. Izmantotās definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

3. Šā testa mērķis ir novērtēt ķīmiskās vielas ietekmi uz saldūdens mikroskopisko aļģu un/vai zilaļģu augšanu. Eksponenciāli augošus testa organismus periodiski audzētās kultūrās eksponē testējamajai ķīmiskajai vielai laika periodā, kas parasti ilgst 72 stundas. Lai gan tests ir diezgan īslaicīgs, tas ļauj novērtēt iedarbību uz vairākām paaudzēm.

4. Sistēmas atbildreakcija ir augšanas ātruma samazinājums aļģu kultūru sērijās (testa vienībās), kas eksponētas dažādu koncentrāciju testējamās ķīmiskās vielas šķīdumiem. Atbildreakciju vērtē kā ekspozīcijas koncentrācijas funkciju, salīdzinot ar replikātu – ekspozīcijai nepakļauto kontrolgrupu – augšanas ātruma vidējo vērtību. Lai iegūtu pilnīgu ainu par sistēmas reakciju uz toksisko ekspozīciju (optimālo jutību), kultūrām ļauj neierobežoti eksponenciāli augt, nodrošinot pietiekami daudz barības vielu un nepārtrauktu gaismu pietiekami ilgi, lai noteiktu specifiskā augšanas ātruma samazināšanos.

5. Augšanu un augšanas inhibēšanos kvantitatīvi nosaka, izmantojot sakarību starp aļģu biomasu un laiku. Aļģu biomasu definē kā sausnas masu uz tilpuma vienību, piemēram, miligramus aļģu uz litru testa šķīduma. Tomēr sausnas masa ir grūti mērāma, tāpēc izmanto aizstājējparametrus. Visbiežāk izmantotais aizstājējparametrs ir šūnu skaits. Citi aizstājējparametri ir šūnu tilpums, fluorescence, optiskais blīvums u. c. Ir jāzina pārrēķina koeficients starp izmērīto aizstājējparametru un biomasu.

6. Testēšanas beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko izsaka kā biomasas logaritmisko pieaugumu (vidējo specifisko augšanas ātrumu) ekspozīcijas perioda laikā. No specifiskā augšanas ātruma vidējām vērtībām, kas reģistrētas testa šķīdumu sērijā, nosaka koncentrāciju, kas rada noteiktu x % (piemēram, 50 %) augšanas ātruma inhibēšanās vērtību, un to izsaka kā E_rC_x (piemēram, E_rC_{50}).

7. Šajā testēšanas metodē izmantotais papildu atkarīgais mainīgais ir ražība, kas var būt nepieciešams, lai dažās valstīs izpildītu īpašas reglamentējošas prasības. To nosaka, no biomasas apjoma ekspozīcijas perioda beigās atņemot biomasas apjomu ekspozīcijas perioda sākumā. No ražības, kas reģistrēta testa šķīdumu rindā, aprēķina koncentrāciju, kas rada noteiktu x % (piemēram, 50 %) ražības inhibēšanās vērtību, un to izsaka kā E_yC_x (piemēram, E_yC_{50}).

8. Turklāt statistiski var noteikt zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju *(LOEC)* un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)*.

▼M6

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

9. Informācijā par testējamo ķīmisko vielu, kas var būt noderīga, nosakot testēšanas apstākļus, ietver tās struktūrformulu, tīrību, stabilitāti gaismā, stabilitāti testa apstākļos, gaismas absorbcijas īpašības, pKa un pētījumu rezultātus par pārveidošanos, tostarp bionoārdāmību ūdenī.

10. Jāzina testējamās ķīmiskās vielas šķīdība ūdenī, sadalījuma koeficients oktanolā/ūdenī (P_{ow}) un tvaika spiediens, un jābūt pieejamai validētai metodei ķīmiskās vielas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ar zināmu atgūstamības koeficientu un detektēšanas robežu.

TESTA DERĪGUMS

11. Lai tests būtu derīgs, ir jāizpilda šādi veiktspējas kritēriji:

— kontrolgrupu biomasai 72 stundu laikā eksponenciāli jāpieaug vismaz 16-kārtīgi. Tas atbilst specifiskajam augšanas ātrumam 0,92 dienas^{-1}. Visbiežāk izmantoto sugu augšanas ātrums parasti ir ievērojami augstāks (sk. 2. papildinājumu). Šis kritērijs var netikt izpildīts, ja izmanto sugas, kas aug lēnāk nekā tās, kas uzskaitītas 2. papildinājumā. Tādā gadījumā testēšanas laiku pagarina, lai iegūtu vismaz 16-kārtīgu pieaugumu kontrolgrupās, visu testa laiku saglabājot eksponenciālu augšanu. Šo testēšanas periodu var samazināt vismaz līdz 48 stundām, lai uzturētu neierobežotu eksponenciālu pieaugumu testēšanas laikā tik ilgi, līdz ir sasniegts minimālais ekponenciāla pieauguma koeficients 16;

— katrā posmā specifiskā augšanas ātruma variācijas koeficienta vidējā vērtība (0–1, 1–2 un 2–3 dienā 72 stundu testiem) kontrolgrupām (sk. 1. papildinājumu par variācijas koeficientu) nedrīkst pārsniegt 35 %. Par katra posma specifiskā augšanas ātruma aprēķināšanu sk. 49. punktu. Šis kritērijs attiecas uz kontrolgrupu replikātu variācijas koeficientu vidējo vērtību;

— vidējā specifiskā augšanas ātruma variācijas koeficients replikātu kontrolgrupu kultūrās visā testēšanas laikā nedrīkst pārsniegt 7 %, ja testēšanā lieto *Pseudokirchneriella subcapitata* un *Desmodesmus subspicatus*. Citām, testēšanā retāk izmantotām sugām šai vērtībai nevajadzētu pārsniegt 10 %.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

12. Ķīmisko(-ās) standartvielu(-as), piemēram, 3,5-dihlorfenolu, kas izmantots starptautiskajā salīdzinošajā testēšanā (1), var lietot testēšanas metodes pārbaudei. Zaļaļģēm par ķīmisko standartvielu var izmantot arī kālija dihromātu. Ķīmiskās standartvielas testēšanu ieteicams veikt vismaz divas reizes gadā.

TESTA IZMANTOJAMĪBA

13. Šo testēšanas metodi vislabāk var izmantot ūdenī šķīstošām ķīmiskajām vielām, kas testa apstākļos, visticamāk, paliks ūdenī. Lai testētu gaistošas, izteikti adsorbējošas, krāsainas ķīmiskas vielas vai ūdenī vāji šķīstošas

▼M6

vielas, vai arī vielas, kas var ietekmēt barības vielu vai minerālvielu pieejamību testēšanas barotnē, aprakstītā procedūra var būt jāpielāgo (piemēram, noslēgta sistēma, testēšanā izmantoto trauku kondicionēšana). Norādījumi par dažām atbilstošām izmaiņām ir sniegti avotos (2), (3) un (4).

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Aprīkojums

14. Testēšanā izmantojamajiem traukiem un citām iekārtām, kas saskaras ar testa šķīdumiem, jābūt pilnībā izgatavotiem no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Priekšmeti ir rūpīgi jāmazgā, lai novērstu organisko vai neorganisko kontaminantu iespējamo ietekmi uz aļģu augšanu vai testa šķīdumu sastāvu.

15. Parasti testēšanā izmantojamie trauki ir stikla kolbas, kam jābūt pietiekami lielām, lai nodrošinātu kultūrām tilpumu, kas nepieciešams mērījumiem testēšanas laikā, kā arī pietiekamu CO_2 masas pārnesi no atmosfēras (sk. 30. punktu). Jāņem vērā, ka šķidruma tilpumam ir jābūt pietiekamam, lai veiktu analītisko noteikšanu (sk. 37. punktu).

16. Turklāt var būt nepieciešams turpmāk minētais aprīkojums vai tā daļa:

— kultūras audzēšanas iekārta: skapis vai kamera, kurā var uzturēt izraudzīto inkubācijas temperatūru ar precizitāti ± 2 °C;

— gaismas mērinstrumenti: jāņem vērā, ka gaismas intensitātes mērīšanas metode un jo īpaši uztvērēja (kolektora) veids var ietekmēt mērījuma vērtību. Mērījumus ieteicams veikt, izmantojot sfērisku (4 π) uztvērēju (kas reaģē uz tiešo un atstaroto gaismu no visiem leņķiem virs un zem mērīšanas plaknes) vai 2 π uztvērēju (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes);

— iekārtas aļģu biomasas noteikšanai. Šūnu skaitu, kas ir visbiežāk izmantotais aļģu biomasas aizstājējparametrs, var noteikt, lietojot daļiņu elektronisko skaitītāju, mikroskopu ar skaitīšanas kameru vai arī plūsmas citometru. Citus biomasas aizstājējparametrus var mērīt, izmantojot plūsmas citometru, fluorimetru, spektrofotometru vai kolorimetru. Ir lietderīgi izmantot pārrēķināšanas koeficientu šūnu skaita pārrēķināšanai sausnas masā. Lai ar spektrofotometru iegūtu derīgus mērījumus, ja biomasas koncentrācija ir maza, var būt nepieciešams izmantot kivetes ar vismaz 4 cm optisko ceļu.

Testa organismi

17. Var izmantot vairākas brīvi dzīvojošu mikroskopisko aļģu un zilaļģu sugas. Ir pierādīta 2. papildinājumā uzskaitīto celmu piemērotība izmantošanai šajā metodē norādītajai testēšanas procedūrai.

18. Izmantojot citas sugas, norāda celmu un/vai tā izcelsmi. Jāpārliecinās, ka visā testēšanas periodā noteiktajos apstākļos var nodrošināt izraudzīto testa aļģu eksponenciālu augšanu.

Audzēšanas barotne

19. Ieteicams izmantot divas alternatīvas barotnes: ESAO un AAP barotnes. Šo barotņu sastāvs norādīts 3. papildinājumā. Jāievēro, ka sākotnējais pH un buferspēja (spēja uzturēt nemainīgu pH) abām barotnēm ir atšķirīga. Tāpēc testu rezultāti var atšķirties atkarībā no tā, kāda barotne ir izmantota, jo īpaši tad, kad tiek testētas ķīmiskās vielas, kas jonizējas.

▼M6

20. Barotnes var būt nepieciešams modificēt noteiktiem mērķiem, piemēram, testējot metālus vai helātus veidojošas vielas vai arī veicot testēšanu pie dažādām pH vērtībām. Ja izmanto modificētas barotnes, tās sīki jāapraksta un lēmums jāpamato (3)(4).

Biomasas sākotnējā koncentrācija

21. Testa kultūru sākotnējai biomasai ir jābūt vienādai visās testa kultūrās un pietiekami mazai, lai kultūra visu inkubācijas periodu varētu augt eksponenciāli, neiztērējot barības vielas. Sākotnējā biomasa, kas aprēķināta kā sausnas masa, nedrīkst pārsniegt 0,5 mg/l. Ir ieteicamas šādas šūnu sākotnējās koncentrācijas:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 – 10^4$ šūnas/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$ šūnas/ml
Navicula pelliculosa	10^4 šūnas/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 šūnas/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$ šūnas/ml

Testējamās vielas koncentrācijas

22. Koncentrāciju diapazonu, kurā, visticamāk, rastos ietekme, var noteikt pēc diapazona noteikšanas testu rezultātiem. Pēdējam – galīgajam – testam jāizvēlas vismaz piecas koncentrācijas, kas sakārtotas ģeometriskā progresijā ar kvocientu, kas nepārsniedz 3,2. Testējamajām ķīmiskajām vielām, kuru koncentrācijas/reakcijas līkne ir lēzena, var būt pieļaujams augstāks kvocients. Koncentrāciju rindai būtu vēlams izraisīt aļģu augšanas ātruma inhibēšana diapazonā 5–75 %.

Replikāti un kontrolgrupas

23. Testēšanas plānā jāparedz katras testējamās koncentrācijas testēšana trijos replikātos. Ja *NOEC* noteikt nav nepieciešams, testēšanas plānu var mainīt, palielinot koncentrāciju skaitu un samazinot katras koncentrācijas replikātu skaitu. Kontrolgrupai nepieciešami vismaz trīs replikāti, bet ideāli to skaitam ir jābūt divas reizes lielākam par katra testējamās koncentrācijas varianta replikātu skaitu.

24. Var sagatavot atsevišķu testa šķīdumu kopumu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju analītiskai noteikšanai (sk. 36. un 38. punktu).

25. Ja testējamās vielas šķīdināšanai lieto šķīdinātāju, testēšanas plānā iekļauj papildu kontrolgrupu, kas satur šķīdumu tādā pašā koncentrācijā, kāda izmantota testa kultūrām.

Inokulācijas kultūras sagatavošana

26. Lai testa aļģes pielāgotu testēšanas apstākļiem un nodrošinātu, ka testa šķīdumu inokulācijai izmantotās aļģes atrodas eksponenciālās augšanas fāzē, 2–4 dienas pirms testa sākuma testēšanas barotnē sagatavo inokulācijas kultūru. Aļģu biomasa ir jākoriģē, lai līdz testa sākumam inokulācijas kultūrā notiktu eksponenciāla augšana. Inokulācijas kultūru inkubē tādos

▼M6

pašos apstākļos kā testa kultūras. Lai pārliecinātos, ka testa celms kultivēšanas apstākļos aug normāli, izmēra inokulācijas kultūras biomasas pieaugumu. Aļģu kultūru audzēšanas piemērs izklāstīts 4. papildinājumā. Lai izvairītos no šūnu vienlaicīgas dalīšanās testēšanas laikā, var būt nepieciešams veikt otro inokulācijas kultūras pavairošanas posmu.

Testa šķīdumu sagatavošana

27. Visos testa šķīdumos jābūt vienādai augšanas barotnes un testa aļģu biomasas sākotnējai koncentrācijai. Testa šķīdumus izraudzītajās koncentrācijās parasti sagatavo, samaisot testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdumu ar augšanas barotni un inokulācijas kultūru. Izejšķīdumu parasti gatavo, izšķīdinot ķīmisko vielu testēšanas barotnē.

28. Šķīdinātājus, piemēram, acetonu, t-butilspirtu un dimetilformamīdu, var izmantot par nesējiem, ar ko testēšanas barotnei pievienot ķīmiskās vielas ar vāju šķīdību ūdenī (2)(3). Šķīdinātāja koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 µl/l, un visām testa sērijas kultūrām (tostarp kontrolgrupām) šķīdinātājs jāpievieno vienādā koncentrācijā.

Inkubācija

29. Testa traukus noslēdz ar gaisu caurlaidīgiem aizbāžņiem. Traukus sakrata un ievieto kultivēšanas aparātā. Testēšanas laikā aļģes jātur suspensijā un jāveicina CO_2 pārnese. Šim nolūkam jāizmanto pastāvīga kratīšana vai maisīšana. Kultūras uztur temperatūrā no 21 līdz 24 °C, temperatūru kontrolējot ar ± 2 °C precizitāti. Tām sugām, kas nav ietvertas 2. papildinājumā, piemēram, tropu sugām, var būt piemērota augstāka temperatūra ar nosacījumu, ka var nodrošināt derīguma kritērijus. Kolbas ir ieteicams izvietot nejaušā secībā un katru dienu mainīt to stāvokli inkubatorā.

30. Kontrolgrupas barotnē testēšanas laikā pH nedrīkst palielināties par vairāk nekā 1,5 vienībām. Metāliem un ķīmiskajām vielām, kas daļēji jonizējas pie testēšanas apstākļiem tuva pH, var būt nepieciešams ierobežot pH izmaiņas, lai iegūtu reproducējamus un skaidri noteiktus rezultātus. Tehniski ir iespējams nodrošināt, ka pH izmaiņas nesasniedz 0,5 vienības, nodrošinot atbilstošu CO_2 masas pārneses ātrumu no apkārtējā gaisa testa šķīdumā, piemēram, palielinot kratīšanas ātrumu. Cita iespēja ir aļģēm nepieciešamā CO_2 daudzuma samazināšana, samazinot sākotnējo biomasu vai saīsinot testēšanas laiku.

31. Virsmai, uz kuras kultūras inkubē, ir jāsaņem pastāvīgs, vienmērīgs fluorescents apgaismojums, piemēram, "vēsi balts" vai "dienasgaismas". Zaļaļģu un ciānbaktēriju celmu gaismas prasības ir atšķirīgas. Gaismas intensitāte ir jāizvēlas atbilstoši izmantotajam testa organismam. Ieteiktajām zaļaļģu sugām gaismas intensitātei testa šķīduma līmenī jābūt diapazonā no 60 līdz 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, to ar piemērotu uztvērēju mērot fotosintētiski efektīvajā viļņu garumu diapazonā no 400 līdz 700 nm. Dažas sugas, jo īpaši *Anabaena flos-aquae*, labi aug zemākā gaismas intensitātē, un pārāk intensīvs apgaismojums radīt bojājumus. Šādām sugām vidējā gaismas intensitāte būtu jāizvēlas diapazonā no 40 līdz 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Gaismas mērinstrumentiem, kas kalibrēti luksos, vēsi baltās gaismas ekvivalents diapazonā no 4 440 līdz 8 880 lx aptuveni atbilst ieteiktajai gaismas intensitātei 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.) Gaismas intensitāte jāuztur ± 15 % robežās no gaismas vidējās intensitātes inkubācijas zonā.

▼M6

Testēšanas ilgums

32. Testēšanas ilgums parasti ir 72 stundas. Tomēr var izmantot īslaicīgāku vai ilglaicīgāku testēšanu – ar nosacījumu, ka var izpildīt visus 11. punktā minētos derīguma kritērijus.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

33. Aļģu biomasa katrā kolbā testēšanas laikā jānosaka vismaz vienu reizi dienā. Ja mērījumus veic, izmantojot no testa šķīduma ar pipeti ņemtus nelielus tilpumus, tos nedrīkst aizstāt.

34. Biomasu mēra, manuāli skaitot šūnas ar mikroskopu vai izmantojot daļiņu elektronisko skaitītāju (pēc šūnu skaita un/vai biotilpuma). Ja var pierādīt apmierinošu korelāciju starp mērījumu rezultātiem un biomasu visā biomasas diapazonā, kas paredzama testēšanas laikā, var izmantot alternatīvas metodes, piemēram, plūsmas citometrisko analīzi, *in vitro* vai *in vivo* hlorofila fluorescences (5)(6) vai optiskā blīvuma metodi.

35. Testēšanas sākumā un beigās ir jāizmēra šķīdumu pH.

36. Ja ir pieejama analītiskā metode testējamās ķīmiskās vielas noteikšanai izmantotajā koncentrāciju diapazonā, jāanalizē testa šķīdumi, lai verificētu to sākotnējās koncentrācijas un ekspozīcijas koncentrāciju uzturēšanu testēšanas laikā.

37. Var būt pietiekami testēšanas sākumā un beigās analizēt testējamās vielas augstu un zemu koncentrāciju un koncentrāciju ap paredzamo EC_{50}, ja ir paredzams, ka ekspozīcijas koncentrācijas testēšanas laikā mainīsies ne vairāk kā par 20 % nominālās vērtības. Ja ir maz ticams, ka koncentrācijas saglabāsies 80–120 % diapazonā no sākotnējās koncentrācijas, ir ieteicams veikt visu testa koncentrāciju analīzi testēšanas sākumā un beigās. Gaistošām, nestabilām vai izteikti adsorbējošām testējamajām ķīmiskajām vielām ekspozīcijas laikā ik pēc 24 stundām ieteicams ņemt papildu paraugus analīzei, lai labāk konstatētu testējamās ķīmiskās vielas zudumu. Šīm ķīmiskajām vielām var būt nepieciešami papildu replikāti. Visos gadījumos testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas ir jānosaka tikai vienā katras pārbaudāmās koncentrācijas replikāta traukā (vai pēc replikāta apvienoto trauku saturam).

38. Testa vide, kas sagatavota īpaši ekspozīcijas koncentrācijas analīzei, testēšanas laikā jāapstrādā tieši tāpat kā vide, ko izmanto testēšanai, t. i., aļģu uzsēšana un inkubācija jāveic identiskos apstākļos. Ja ir nepieciešama izšķīdušās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas analīze, var būt nepieciešams atdalīt aļģes no to barotnes. Atdalīšanu ieteicams veikt centrifūgā pie relatīvi neliela paātrinājuma, kas ir pietiekams aļģu izgulsnēšanai.

39. Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, tad rezultātu analīzes pamatā var būt nominālās vai izmērītās sākotnējās vērtības. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % diapazonā, rezultātu analīzes pamatā jābūt koncentrācijas vidējai ģeometriskajai vērtībai ekspozīcijas laikā vai modeļiem, kas raksturo testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas samazināšanos (3)(7).

▼M6

40. Aļģu augšanas inhibēšanās tests ir dinamiskāka testa sistēma nekā lielākā daļa citu īslaicīgo testu, ko izmanto toksiskuma noteikšanai ūdens vidē. Tāpēc var būt grūti noteikt reālās ekspozīcijas koncentrācijas, jo īpaši adsorbējošām ķīmiskajām vielām, ko testē zemās koncentrācijās. Šādā gadījumā testējamās ķīmiskās vielas izzušana no šķīduma, adsorbējoties pieaugošajā aļģu biomasā, nenozīmē tās izzušanu no testa sistēmas. Analizējot testa rezultātus, jāpārbauda, vai testēšanas gaitā līdz ar testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pazemināšanos samazinās arī augšanas inhibēšanās. Ja tā notiek, var piemērot atbilstošu modeli, kas raksturo testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas samazināšanos (7). Ja ne, rezultātu analīzei var izmantot sākotnējās (nominālās vai izmērītās) koncentrācijas.

Citi novērojumi

41. Lai pārliecinātos par inokulācijas kultūras normālu un veselīgu izskatu, kā arī konstatētu visas aļģu izskata anomālijas (ko var izraisīt eksponēšana testējamai ķīmiskajai vielai), testa beigās jāveic izmeklējumi ar mikroskopu.

Robežtests

42. Noteiktos apstākļos, piemēram, ja sākotnējais tests liecina, ka testējamajai ķīmiskajai vielai nav toksiskas ietekmes koncentrācijās līdz 100 mg/l vai līdz šķīdības robežai testēšanas barotnē (atkarībā no tā, kura no vērtībām ir mazāka), var veikt robežtestu, kurā salīdzina reakciju kontrolgrupā un vienā apstrādātajā grupā (100 mg/l vai koncentrācija, kas vienāda ar šķīdības robežu). Noteikti ieteicams, ka to apstiprina ekspozīcijas koncentrācijas analīze. Uz robežtestu attiecas visi iepriekš aprakstītie testēšanas nosacījumi un derīguma kritēriji, izņemot to, ka jābūt vismaz sešiem apstrādes replikātiem. Kontrolgrupu un apstrādes grupu atkarīgos mainīgos var analizēt, ar statistisku testu, piemēram, Stjūdenta t-testu (*Student t-test*) salīdzinot vidējās vērtības. Ja abu grupu dispersijas nav vienādas, jāveic atšķirīgām dispersijām pielāgots t-tests.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Augšanas līkņu grafiska attēlošana

43. Biomasu testa traukos var izteikt mērījumam izmantotā aizstājējparametra vienībās (piemēram, kā šūnu skaitu, fluorescenci).

44. Lai iegūtu augšanas grafikus, tabulas veidā apkopo datus par biomasas koncentrācijām testa kultūrās un kontrolgrupās, kā arī testējamās vielas koncentrācijām un mērījumu laikiem, ko reģistrē ar precizitāti vismaz līdz veselām stundām. Šajā pirmajā posmā var būt noderīgas gan logaritmiskās, gan lineārās skalas, taču logaritmisko skalu izmantošana ir obligāta un tās kopumā labāk attēlo augšanas norises izmaiņas testēšanas laikā. Jāņem vērā, ka eksponenciāla augšana, attēlota logaritmiskā skalā, rada taisnu līniju un tās slīpums (virziena koeficients) norāda specifisko augšanas ātrumu.

45. Izmantojot grafikus, pārbauda, vai kontrolgrupas kultūras visā testēšanas laikā eksponenciāli aug gaidāmajā ātrumā. Kritiski izvērtē visus datu punktus un grafiku izskatu, un pārbauda, vai izejas datos un procedūrās nav kļūdu. Īpašu uzmanību pievērš visiem datu punktiem, kuru šķietamā novirze sasniedz sistemātiskās kļūdas lielumu. Ja acīmredzami var konstatēt procedūrā pieļautas kļūdas vai ir ļoti iespējams, ka tādas varētu būt, attiecīgo datu punktu atzīmē kā anomālu un turpmākajā statistiskajā analīzē neiekļauj. (Ja aļģu koncentrācija vienā no diviem vai trim varianta replikātu traukiem

▼M6

atbilst nullei, tas, iespējams, norāda, ka trauki nav pareizi uzsēti vai nav bijuši pienācīgi iztīrīti). Testēšanas pārskatā skaidri norāda datu punkta noraidīšanas iemeslus. Pieņemami iemesli ir tikai (reti) kļūdas procedūrā un nevis vienkārši zema precizitāte. Datu statistiskās apstrādes procedūras anomālo vērtību identificēšanai šā tipa problēmām ir izmantojamas ierobežoti, un tās nevar aizstāt eksperta vērtējumu. Anomālās vērtības (atbilstoši identificētas) ieteicams atstāt starp grafikos vai tabulās attēlotajiem datu punktiem.

Atkarīgie mainīgie

46. Testa mērķis ir novērtēt testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz aļģu augšanu. Šajā testēšanas metodē ir iekļauti divu atkarīgo mainīgo apraksti, jo dažādās jurisdikcijās ir priekšroku dod atšķirīgām pieejām un ir atšķirīgas regulējuma vajadzības. Lai testēšanas rezultāti būtu pieņemami visās jurisdikcijās, ietekme ir jāizvērtē, izmantojot abus turpmāk aprakstītos atkarīgos mainīgos – a) un b).

a) Vidējais specifiskais augšanas ātrums: šo atkarīgo mainīgo aprēķina, pamatojoties uz biomasas logaritmisko pieaugumu testēšanas laikā, un tā mērvienība ir biomasas pieaugums dienā.

b) Ražība: šis atkarīgais mainīgais ir testēšanas beigu biomasa, no kā atņemta testēšanas sākuma biomasa.

47. Jānorāda, ka toksiskuma vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos abus atkarīgos mainīgos, nav savstarpēji salīdzināmas, un šī atšķirība jāapzinās, izmantojot testa rezultātus. Tā kā katras pieejas matemātiskais pamats ir atšķirīgs, tad, ja būs ievēroti šīs testa metodes testa nosacījumi, EC_x vērtības, kuru pamatā ir vidējais specifiskais augšanas ātrums (E_rC_x), kopumā būs augstākas nekā rezultāti, kuru pamatā ir ražība (E_yC_x). To nedrīkst interpretēt kā šo abu iegūto parametru jutības atšķirību; šīs vērtības vienkārši ir matemātiski atšķirīgas. Vidējā specifiskā augšanas ātruma koncepcijas pamatā ir aļģu vispārējais eksponenciālās augšanas modelis kultūrās, kuru augšanu neierobežo; toksiskumu tajās aplēš pēc ietekmes uz augšanas ātrumu neatkarīgi no kontrolgrupas absolūtā specifiskā augšanas ātruma līmeņa, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficienta vai testa ilguma. Savukārt rezultāti, kuru pamatā esošais atkarīgais mainīgais ir ražība, ir atkarīgi no visiem citiem minētajiem mainīgajiem. E_yC_x ir atkarīgs no katrā testā iekļauto aļģu sugu vidējā specifiskā augšanas ātruma un no maksimālā specifiskā augšanas ātruma, kas var būt atšķirīgs ne tikai katrai sugai, bet arī dažādiem aļģu celmiem. Šo atkarīgo mainīgo nevajadzētu izmantot, lai salīdzinātu dažādu aļģu sugu vai pat atšķirīgu celmu jutību pret toksikantiem. Kaut arī zinātnē priekšroku dod toksiskuma noteikšanai pēc vidējā specifiskā augšanas ātruma, lai apmierinātu dažu valstu pašreizējās regulatīvās prasības, šajā testēšanas metodē ir ietverta arī toksiskuma noteikšana pēc ražības.

Vidējais augšanas ātrums

48. Konkrēta perioda vidējo specifisko augšanas ātrumu aprēķina saskaņā ar vienādojumu kā biomasas logaritmisko pieaugumu katram kontrolgrupas un apstrādes traukam [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{diena}^{-1}) \qquad [1],$$

kur:

μ_{i-j} ir vidējais specifiskais augšanas ātrums laika periodā no i līdz j;

X_i ir biomasa laikā i;

X_j ir biomasa laikā j.

Katrā apstrādes grupā un kontrolgrupā aprēķina vidējo augšanas ātrumu un aplēš dispersiju.

49. Visa testēšanas laika (parasti no 0. līdz 3. dienai) vidējo specifisko augšanas ātrumu aprēķina, par sākotnējo vērtību izmantojot nominālo uzsēto biomasu, nevis izmērīto sākotnējo vērtību, jo šādi parasti var panākt lielāku precizitāti. Ja biomasas mērīšanā izmantotais aprīkojums (piemēram, plūsmas citometrs) ļauj pietiekami precīzi noteikt mazo inokulācijas biomasu, var izmantot izmērīto sākotnējo biomasas koncentrāciju. Jānovērtē arī katra posma augšanas ātrums, ko aprēķina kā katras testēšanas dienas vidējo specifisko augšanas ātrumu (0.–1. diena, 1.–2. diena un 2.–3. diena) un jānoskaidro, vai kontrolgrupas augšanas ātrums saglabājas nemainīgs (sk. derīguma kritērijus, 11. punkts). Par vidējo kopējo specifisko augšanas ātrumu būtiski zemāks specifiskais augšanas ātrums pirmajā dienā var liecināt par kultūras atrašanos kavējuma fāzē, kurā tā attīstās lēni. Ja kontrolgrupas kultūrās kavējuma fāzi var saīsināt vai pat novērst, veicot pareizu mātes kultūras pavairošanu, eksponētajās kultūrās kavējuma fāze var liecināt par reģenerāciju pēc sākotnējā toksiskā stresa vai samazinātu ekspozīciju testējamās ķīmiskās vielas zuduma dēļ (tostarp sorbciju pie aļģu biomasas) pēc sākotnējās ekspozīcijas. Tādēļ var veikt augšanas ātruma novērtējumu pa posmiem, lai novērtētu testējamās ķīmiskās vielas ietekmi ekspozīcijas laikā. Vidējā augšanas ātruma būtiskas atšķirības no individuālo posmu augšanas ātruma liecina par novirzi no konstantas eksponenciālas augšanas un to, ka rūpīgi jāanalizē augšanas līknes.

50. Katram apstrādes replikāta augšanas ātruma procentuālo inhibēšanos aprēķina saskaņā ar vienādojumu [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

kur:

$\%I_r$ = vidējā specifiskā augšanas ātruma inhibēšanās procentos;

μ_C = vidējā specifiskā augšanas ātruma vidējā vērtība (μ) kontrolgrupā;

μ_T = apstrādes replikāta vidējais specifiskais augšanas ātrums.

51. Ja testa šķīdumu gatavošanai lieto šķīdinātājus, inhibēšanās procentu aprēķināšanā jāizmanto nevis kontrolgrupas bez šķīdinātājiem, bet gan kontrolgrupas ar šķīdinātājiem.

Ražība

52. Ražību aprēķina, no testa beigu biomasas atņemot testa sākuma biomasu katram kontrolgrupas un apstrādes traukam. Katrai testa koncentrācijai un kontrolgrupai jāaprēķina ražības vidējā vērtība, kā arī jānosaka dispersija. Ražības procentuālo inhibēšanos ($\%I_y$) katram apstrādes replikātam var aprēķināt šādi:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

kur:

$\%I_y$ = ražības procentuālā inhibēšanās;

Y_C = kontrolgrupas ražības vidējā vērtība;

Y_T = konkrēta apstrādes replikāta ražības vērtība.

Koncentrācijas–atbildreakcijas līknes grafiska attēlošana

53. Procentuālā inhibēšanās jāattēlo grafiski attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas logaritmu un grafiks sīki jāizpēta, ignorējot tos datu punktus, kas pirmajā posmā tikuši atlasīti kā anomālas vērtības. Lai gūtu pirmo iespaidu par koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību, manuāli vai ar datorizētu interpolāciju jānovelk gluda līnija caur datu punktiem, bet turpmāk jāizmanto detalizētāka metode, vēlams – datorizēta statistiskas metode. Atkarībā no tā, kādam nolūkam datus paredzēts izmantot, kāda ir datu kvalitāte (precizitāte) un apjoms un kāda ir datu analīzes instrumentu pieejamība, var nolemt (un dažkārt ir pilnīgi pamatoti) šajā posmā datu analīzi izbeigt un vienkārši nolasīt galvenos rādītājus EC_{50} un EC_{10} (un/vai EC_{20}) no vizuāli piemeklētas līknes (sk. arī sadaļu par stimulējošo iedarbību). Iemesli, kas attaisno statistiskās metodes neizmantošanu ir, piemēram:

— dati nav piemēroti, lai ar datorizētām metodēm radītu vēl ticamākus rezultātus, nekā var iegūt ar ekspertu slēdzienu – šādā gadījumā dažas datorprogrammas pat var nespēt radīt uzticamus risinājumus (iterācijas var nekonverģēt u. c.);

— stimulētas augšanas reakcijas nevar atbilstoši apstrādāt, izmantojot pieejamās datorprogrammas (sk. turpmāk).

Statistiskās metodes

54. Mērķis ir regresijas analīzē iegūt kādu kvantitatīvu koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību. Kad atbildreakcijas dati linearizējoši transformēti probita, logita vai Veibula vienībās (8), iespējams izmantot svērtu lineāro regresiju, tomēr priekšroku mēdz dot nelineārām regresijas procedūrām, jo tajās vieglāk tikt galā ar neizbēgamajām datu anomālijām un novirzēm no gludiem sadalījumiem. Ja inhibēšanās vai nu tuvojas nullei, vai ir pilnīga, transformācija var šādas anomālijas samilzināt, jūtami sagrozot analīzes rezultātus (8). Būtu jāatceras, ka analīzes standartmetodes, kurās izmanto probita, logita vai Veibula transformācijas, ir domātas darbam ar binārajiem datiem (piem., izdzīvošanas/neizdzīvošanas datiem) un, lai tās būtu izmantojamas darbam ar augšanas vai biomasas datiem, tās jāmodificē. Īpašas metodes EC_x vērtību noteikšanai no bezpārtraukumu datiem ir izklāstītas (9), (10) un (11) avotā. Nelineārās regresijas analīze sīkāk aprakstīta 5. papildinājumā.

55. Lai aplēstu EC_x punktveida vērtības, katram analizējamajam atkarīgajam mainīgajam jāizmanto koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība. Ja iespējams, katrai aplēstajai vērtībai jānosaka 95 % ticamības robeža. Iegūto datu atbilstība regresijas modelim jānovērtē grafiski vai statistiski. Regresijas analīze jāveic, izmantojot katrā atsevišķā replikātā iegūtās atbildreakcijas vērtības, nevis apstrādes variantu grupu vidējās vērtības. Ja tomēr nelineārās līknes

▼M6

pielāgošana ir sarežģīta vai to nav iespējams veikt, jo datu izkliede ir pārāk liela, šo problēmu var apiet, veicot grupas vidējo rādītāju regresiju, praktiski samazinot anomālo vērtību ietekmi. Testēšanas pārskatā jānorāda, ka izmantota šī iespēja – novirze no parastās procedūras –, jo līknes pielāgošana atsevišķu replikātu vērtībām nav sniegusi labu rezultātu.

56. EC_{50} aplēses un ticamības robežas var noteikt, arī izmantojot lineāro interpolāciju ar "bootstrapping" metodi (13), ja pieejamie regresijas modeļi/metodes nav piemērotas datiem.

57. *LOEC* un tādējādi *NOEC* aplēšanai, lai noskaidrotu testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz augšanas ātrumu, ir nepieciešams salīdzināt apstrādes replikātu vidējās vērtības, izmantojot dispersijas analīzes *(ANOVA)* metodes. Katras koncentrācijas vidējā vērtība jāsalīdzina ar kontrolgrupas vidējo vērtību, izmantojot atbilstošu multiplās salīdzināšanas vai trenda testa metodi. Iespējams, būs noderīgs Daneta *[Dunnett]* vai Viljamsa *[Williams]* tests (12)(14)(15)(16)(17). Jānovērtē, vai ir spēkā pieņēmums par dispersijas homogenitāti, kas ir *ANOVA* pamatā. Šo novērtējumu var veikt grafiski vai izmantojot formālu testu (17). Piemērots ir Levena *[Levene]* vai Bārtleta *[Bartlett]* tests. Dispersijas homogenitātes pieņēmuma neatbilstību dažkārt var koriģēt, izmantojot datu logaritmisko transformāciju. Ja dispersijas heterogenitāte ir pārlieku liela un to nevar koriģēt ar transformāciju, jāveic analīze ar tādām metodēm kā descendents Džonkhīra *[Jonckheere]* trenda tests. Papildu norādījumus par *NOEC* noteikšanu sk. (11).

58. Jaunākie sasniegumi zinātnē ir bijuši par pamatu ieteikumam atteikties no *NOEC* jēdziena un aizstāt to ar EC_x punktveida vērtību aplēsanu ar regresiju. Šim aļģu testam nav noteikta piemērota x vērtība. Piemērots šķiet diapazons no 10 līdz 20 % (atkarībā no izraudzītā atkarīgā mainīgā), un ieteicams pārskatā iekļaut gan EC_{10}, gan EC_{20}.

Augšanas stimulācija

59. Dažkārt zemās koncentrācijās novēro augšanas stimulāciju (negatīvu inhibēšanos). To var radīt vai nu hormēze ("toksiskā stimulācija"), vai augšanu veicinošu faktoru pievienošana izmantotajai minimālajai barotnei ar testējamo vielu. Jāņem vērā, ka neorganisko barības vielu pievienošanai navajadzētu atstāt tiešu ietekmi, jo testēšanas barotnē visā testa laikā ir jābūt barības vielu pārpalikumam. Mazu stimulācijas devu EC_{50} aprēķinos parasti var neņemt vērā, ja vien stimulācija nav ārkārtēja. Tomēr, ja tā ir ārkārtēja vai ir jāaprēķina EC_x lielums zemam x, var būt nepieciešamas īpašas metodes. Ja iespējams, no datu analīzes nevajadzētu izslēgt stimulējošas reakcijas, un, ja ar izmantojamo līknes piemeklēšanas programmatūru nav iespējams akceptēt nelielu stimulāciju, var izmantot lineāro interpolāciju ar "bootstrapping". Ārkārtējas stimulācijas gadījumā var apsvērt hormēzes modeļa izmantošanu (18).

Netoksiska augšanas inhibēšana

60. Gaismu absorbējoši testa materiāli var samazināt augšanas ātrumu, jo noēnojums samazina pieejamās gaismas daudzumu. Šāda fiziskā ietekme ir jānodala no toksiskās ietekmes, modificējot testa apstākļus, un fiziskā ietekme ir jānorāda atsevišķi. Norādījumi ir pieejami (2) un (3).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

61. Testēšanas pārskatā jāiekļauj turpmāk norādītā informācija.

▼**M6**

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības, tostarp ūdensšķīdības robežas;

— ķīmiskās vielas identifikācijas dati (piemēram, *CAS* numurs), tostarp tīrības pakāpe (piemaisījumi).

Testa suga:

— celms, piegādātājs vai avots un izmantotie kultivēšanas apstākļi.

Testa apstākļi:

— testa sākuma un beigu datums un tā ilgums;

— testēšanas plāna apraksts: testa trauki, kultūru tilpums, biomasas blīvums testēšanas sākumā;

— barotnes sastāvs;

— testa koncentrācijas un replikāti (piemēram, replikātu skaits, testa koncentrāciju skaits un izmantotā ģeometriskā progresija);

— testa šķīdumu sagatavošanas apraksts, tostarp šķīdinātāju izmantošana u. c.

— kultūras audzēšanas iekārta;

— gaismas intensitāte un kvalitāte (avots, homogenitāte);

— temperatūra;

— testētās koncentrācijas: nominālās testa koncentrācijas un visi to analīžu rezultāti, ar kuriem nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju testa traukos. Pārskatā iekļaujama arī informācija par metodes atgūstamības efektivitāti un kvantitatīvās noteikšanas robežu testa matricā;

— visas atkāpes no šīs testēšanas metodes;

— biomasas noteikšanas metode un pierādījumi par korelāciju starp izmērīto parametru un saussvaru.

Rezultāti:

— visu apstrādes replikātu pH vērtības testa sākumā un beigās;

— biomasa katrā kolbā katrā mērījumu punktā un biomasas mērīšanas metode;

— augšanas līknes (biomasas izmaiņu grafisks attēlojums attiecībā pret laiku);

— aprēķinātie atbildreakcijas mainīgie katram apstrādes replikātam, to vidējās vērtības un replikātu variācijas koeficienti;

— koncentrācijas/ietekmes sakarības grafisks attēlojums;

▼M6

— atkarīgo mainīgo, piemēram, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} toksicitātes aplēšana un ar tiem saistītie ticamības intervāli. Ja aprēķina *LOEC* un *NOEC*, norāda arī tos, kā arī to aprēķināšanai lietotās statistiskās metodes;

— ja ir izmantota *ANOVA*, detektējamais iedarbības apmērs (piemēram, mazākā nozīmīgā atšķirība);

— apstrādes replikātos konstatētā augšanas stimulēšana;

— cita konstatētā ietekme, piemēram, aļģu morfoloģiskās izmaiņas;

— rezultātu iztirzājums, minot arī jebkādu ietekmi uz testēšanas rezultātiem, kuras iemesls ir atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442 Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and 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.* Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. 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. US EPA, 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. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

1. papildinājums

Definīcijas

Attiecībā uz minēto testa metodi izmanto šādas definīcijas un saīsinājumus.

Biomasa ir dzīvo organismu sausā masa populācijā, un to var izteikt kā attiecību pret noteiktu tilpumu; piemēram, mg aļģu litrā testa šķīduma. Parasti "biomasa" ir definēta kā masa, bet šajā testā vārds tiek lietots, lai apzīmētu masu tilpumā. Šajā testā parasti tiek mērīti arī biomasas aizstājējparametri, piemēram, šūnu skaits, fluorescence u. c., un tādējādi termina "biomasa" lietojums attiecas arī uz aizstājējparametriem.

Ķīmiska viela ir viela vai to maisījums.

Variācijas koeficients ir parametra svārstību bezdimensiju mērs, ko izsaka kā attiecību starp standartnovirzi un vidējo. To var izteikt arī procentos. Vidējā specifiskā augšanas ātruma vidējais variācijas koeficients replikātu kontrolgrupu kultūrās aprēķināms šādi:

1. vidējā specifiskā augšanas ātruma variācijas koeficientu % aprēķina, izmantojot attiecīgā replikāta dienas / katra posma augšanas ātrumu;

2. vidējo vertību aprēķina, izmantojot visus 1. punktā minētos lielumus, lai iegūtu vidējo dienas / katra posma specifiskā augšanas ātruma variācijas koeficientu replikātu kontrolgrupu kultūrās.

EC_x ir testēšanas barotnē izšķīdinātas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kuras rezultāts ir testa organismu augšanas samazinājums par x % (piemēram, par 50 %) noteiktā ekspozīcijas periodā (skaidri jānorāda, ja tas atšķiras no pilna vai normāla testa ilguma). Lai nepārprotami norādītu EC vērtību, kas iegūta no augšanas ātruma vai ražības, izmanto simbolu "E_rC" augšanas ātrumam, bet "E_yC" – ražībai.

Augšanas barotne ir pilnīga sintētiska kultūras barotne, kurā aug testa aļģes, kad tās tiek eksponētas testējamai ķīmiskajai vielai. Testējamo ķīmisko vielu parasti izšķīdina testēšanas barotnē.

Augšanas ātrums (vidējais specifiskais augšanas ātrums) ir biomasas logaritmiskais pieaugums ekspozīcijas laikā.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija *(LOEC)* ir zemākā testētā koncentrācija, pie kuras novērotajai ķīmiskajai vielai noteiktā ekspozīcijas laikposmā novēro statistiski nozīmīgu samazinošu ietekmi uz augšanu (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontrolgrupu. Tomēr visām testa koncentrācijām, kas pārsniedz *LOEC*, jāuzrāda kaitīga ietekme, kura ir vienāda ar vai lielāka par to, kas novērojama pie *LOEC*. Ja ir neiespējami nodrošināt šos abus nosacījumus, jāsniedz izsmeļošs izskaidrojums, kā izraudzīta *LOEC* (un tādējādi *NOEC*).

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija *(NOEC)* ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas ir tieši zem *LOEC* koncentrācijas.

Atkarīgais mainīgais ir mainīgais, ar ko aplēš toksicitāti un ko, izmantojot dažādas aprēķina metodes, iegūst no jebkuriem izmērītajiem parametriem, kuri raksturo biomasu. Šai testa metodei atkarīgie mainīgie ir augšanas ātrums un ražība, kurus iegūst, tieši izmērot biomasu vai kādu no tās aizstājējparametriem.

▼M6

Specifiskais augšanas ātrums ir atkarīgs mainīgais, ko definē kā novērojamā parametra (šajā testēšanas metodē – biomasas) naturālo logaritmu starpības dalījumu ar attiecīgā perioda ilgumu.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Ražība ir mērījuma mainīgā vērtība ekspozīcijas perioda beigās, no kuras atņemta mērījuma mainīgā vērtība ekspozīcijas perioda sākumā, lai izteiktu biomasas pieaugumu testēšanas laikā.

▼M6

2. papildinājums

Celmi, kuru derīgums testēšanai pierādīts

Zaļaļģes

Pseudokirchneriella subcapitata (iepriekšējais nosaukums: *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (iepriekšējais nosaukums: *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Diatomejas

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Zilaļģes

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Celmu ieguves avoti

Ieteiktie celmi ir pieejami kā vienaļģes kultūras no šādām kolekcijām (alfabētiskā secībā):

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
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M6

Ieteikto sugu izskats un īpašības

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Izskats	Izliektas, savītas atsevišķas šūnas	Ovālas, lielākoties atsevišķas šūnas	Nūjiņas	Ovālu šūnu virknes	Nūjiņas
Izmērs (garums × platums) μm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Šūnas tilpums (μm^3/šūna)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Sausas šūnas svars (mg/šūna)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Augšanas ātrums (3) ($diena^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Izmērīts ar daļiņu elektronisko skaitītāju.
(2) Aprēķināts pēc izmēra.
(3) Visbiežāk novērotais augšanas ātrums ESAO barotnē pie gaismas intensitātes apt. 70 μE m^{-2} s^{-1} un 21 °C.

Īpaši norādījumi par ieteicamo testa sugu kultivēšanu un uzturēšanu

Pseudokirchneriella subcapitata un Desmodesmus subspicatus

Šīs zaļaļģes kopumā ir viegli audzējamas dažādās barotnēs. Informācija par piemērotām barotnēm ir pieejama no kultūru kolekcijām. Šūnas parasti attīstās atsevišķi, un šūnu blīvumu var viegli izmērīt ar daļiņu elektronisko skaitītāju vai mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Izejkultūras uzturēšanai var izmantot dažādas barotnes. Īpaši svarīgi ir neļaut periodiskajai kultūrai atjaunojoties pāriet no logaritmiskās augšanas fāzes nākamajā fāzē, jo tas apgrūtina kultūras ataudzēšanu.

Anabaena flos-aquae veido cieši saistītu šūnu ķēdes. Šo agregātu izmēri var atšķirties atkarībā no kultivēšanas apstākļiem. Lai biomasas noteikšanā izmantotu mikroskopu vai daļiņu elektronisko skaitītāju, šie agregāti var būt jāsadala.

Lai samazinātu skaitīšanas rezultātu mainību, ķēdes var izjaukt, apakšparaugus sonicējot. Ja sonikācijas ilgums pārsniedz ķēžu sadalīšanai nepieciešamo, tā šūnas var iznīcināt. Katra apstrādes replikāta sonikācijas intensitātei un ilgumam jābūt vienādam.

Lai kompensētu mainīgumu, ir ar hemocitometru jāizskaita pietiekami daudz lauku (vismaz 400 šūnas). Tas uzlabo mikroskopiskās blīvuma noteikšanas ticamību.

Lai noteiktu kopējo *Anabaena* šūnu tilpumu, pēc šūnu ķēžu sadalīšanas ar piesardzīgi veiktu sonifikāciju var izmantot daļiņu elektronisko skaitītāju. Sonifikācijas enerģijai ir jābūt tādai, lai šūnas nesabojātu.

Lai testa trauku inokulācijai izmantotā aļģu suspensija būtu labi sajaukta un homogēna, maisīšanai izmanto vorteksu vai līdzīgu piemērotu metodi.

▼M6

Testa trauki ir jānovieto uz kratītājplatformas, kas izdara orbitālas vai turp/atpakaļ svārstības apm. 150 reizes minūtē. Lai mazinātu *Anabaena* tendenci veidot pikas, var veikt maisīšanu ar pārtraukumiem. Ja ir izveidojušās pikas, jāpārliecinās, ka biomasas mērījumiem ņemtie paraugi ir reprezentatīvi. Pirms paraugu ņemšanas var būt nepieciešama enerģiska kratīšana, lai izjauktu aļģu pikas.

Synechococcus leopoliensis

Izejkultūras uzturēšanai var izmantot dažādas barotnes. Informācija par piemērotām barotnēm ir pieejama no kultūru kolekcijām.

Synechococcus leopoliensis attīstās kā atsevišķas nūjiņveida šūnas. Šūnas ir ļoti sīkas, līdz ar to biomasu ir grūti mērīt, skaitīšanai izmantojot mikroskopu. Ieteicams izmantot elektroniskos daļiņu skaitītājus, ar ko var saskaitīt pat apmēram 1 μm lielas daļiņas. Var izmantot arī *in vitro* fluorometriskos mērījumus.

Navicula pelliculosa

Izejkultūras uzturēšanai var izmantot dažādas barotnes. Informācija par piemērotām barotnēm ir pieejama no kultūru kolekcijām. Jāievēro, ka barotnei jāpievieno silikāts.

Navicula pelliculosa noteiktos augšanas apstākļos var veidot agregātus. Izdaloties lipīdiem, aļģu šūnas dažkārt akumulējas virsmas plēvē. Šajos apstākļos jāveic īpaši pasākumi, lai, ņemot apakšparaugus biomasas noteikšanai, iegūtu reprezentatīvus paraugus. Iespējams, būs nepieciešama intensīva kratīšana, piemēram, izmantojot vorteksu.

▼**M6**

3. papildinājums

Augšanas barotne

Var izmantot kādu no šīm divām barotnēm:

— ESAO barotne: sākotnējā ESAO *TG* 201 barotne, arī saskaņā ar ISO 8692;

— ASV *EPA* barotne AAP, kas ir saskaņā arī ar *ASTM*.

Sagatavojot šīs barotnes, jāizmanto reaģenta vai analītiskās tīrības pakāpes vielas un dejonizēts ūdens.

AAP barotnes (ASV *EPA*) un ESAO *TG* 201 barotņu sastāvs

Komponents	AAP		ESAO	
	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
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

EDTA molārā attiecība pret dzelzi nedaudz pārsniedz vienu. Tas novērš dzelzs nogulsnēšanos un vienlaikus līdz minimumam samazina smago metālu jonu helātu veidošanos.

Testos ar diatomeju *Navicula pelliculosa* abām barotnēm ir jāpievieno $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, lai iegūtu koncentrāciju 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

Barotnes pH iegūst, līdzsvarojot barotnes karbonātu sistēmu un CO_2 parciālo spiedienu atmosfēras gaisā. Aptuvenā sakarība starp pH pie 25 °C un bikarbonāta molāro koncentrāciju ir šāda:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (ASV *EPA* barotne); 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (ESAO barotne).

Testa barotnes elementu sastāvs

Elements	AAP	ESAO
	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

ESAO barotnes sagatavošana

Barības viela	Koncentrācija izejšķīdumā
1. izejšķīdums: makroelementi	
$NH_4 \cdot Cl$	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
2. izejšķīdums: dzelzs	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
3. izejšķīdums: mikroelementi	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Barības viela	Koncentrācija izejšķīdumā
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	7 mg/l
4. izejšķīdums: bikarbonāts	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Izejšķīdumu sterilizē ar membrānfiltrāciju (vidējais poras diametrs 0,2 μm) vai autoklavējot (120 · C, 15 min). Šķīdumi uzglabājami tumsā 4 °C temperatūrā.

2. un 4. izejšķīdumu neapstrādā autoklāvā, bet sterilizē, izmantojot membrānfiltrāciju.

Barotni sagatavo, ūdenim pievienojot atbilstošu 1.–4. izejšķīduma tilpumu:

Pievieno apm. 500 ml sterila ūdens:

10 ml 1. izejšķīduma;

1 ml 2. izejšķīduma;

1 ml 3. izejšķīduma;

1 ml 4. izejšķīduma.

Papildina ar sterilizētu ūdeni līdz 1 000 ml.

Jādod pietiekami daudz laika, lai starp barotni un atmosfēru līdzsvarotos CO_2, ja nepieciešams, vairākas stundas tajā pūšot sterilu, filtrētu gaisu.

ASV EPA barotnes sagatavošana

1. Pievienot 1 ml katra 2.1.–2.7. punktā minētā izejšķīduma aptuveni 900 ml dejonizēta vai destilēta ūdens un atšķaidīt līdz 1 litram.

2. Makroelementu izejšķīdumus izgatavo, turpmāk minētās vielas izšķīdinot 500 ml dejonizēta vai destilēta ūdens. 2.1., 2.2., 2.3. un 2.4. apakšpunktā minētos reaģentus var apvienot vienā izejšķīdumā.

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.	Mikroelementu izejšķīdums (sk.3. punktu).	
2.5.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6.	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7.	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8.	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Sk. 1. piezīmi.

▼**M6**

1. piezīme. Izmanto tikai diatomeju sugu testēšanai. Var pievienot tieši (202,4 mg) vai ar izejšķīdumu, lai iegūtu 20 mg/l Si galīgo koncentrāciju barotnē.

3. Mikroelementu izejšķīdumu izgatavo, turpmāk minētās vielas izšķīdinot 500 ml dejonizēta vai destilēta ūdens.

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.	CoCl2·6H2O	0,714 mg.	
3.6.	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7.	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8.	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[Dinātrija (etilēndinitrilo) tetraacetāts].
3.9.	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg.	Sk. 2. piezīmi.

2. piezīme. Izmanto tikai diatomeju sugu izejkultūru barotnēs.

4. Koriģēt pH līdz 7,5 ± 0,1 ar 0,1 *N* vai 1,0 *N* NaOH vai HCl.

5. Barotne jāielej sterilā konteinerā, filtrējot caur 0,22 μm membrānfiltru, ja tiks izmantots daļiņu skaitītājs, vai 0,45 μm filtru, ja daļiņu skaitītājs netiks izmantots.

6. Līdz lietošanai barotni glabā tumsā apmēram 4 °C temperatūrā.

▼M6

4. papildinājums

Aļģu audzēšanas metodes piemērs

Vispārīgi apsvērumi

Turpmāk izklāstītās audzēšanas metodes mērķis ir iegūt aļģu kultūras toksicitātes testiem.

Jāizmanto piemērotas metodes, lai nodrošinātu, ka aļģu kultūras netiek inficētas ar baktērijām. Var būt vēlams izmantot aksēniskas kultūras, bet būtiski ir izveidot un lietot vienaļģes kultūras.

Visas darbības ir jāveic sterilos apstākļos, lai izvairītos no kontaminācijas ar baktērijām vai citām aļģēm.

Iekārtas un materiāli

Sk. sīkāk testēšanas metodes sadaļā "Aprīkojums".

Aļģu kultūru iegūšanas metodes

Barības vielu šķīdumu (barotņu) sagatavošana

Visus barotnē esošos barības vielu sāļus sagatavo koncentrētu izejšķīdumu veidā un glabā tumšā un vēsā vietā. Šos šķīdumus sterilizē filtrējot vai autoklavējot.

Barotni sagatavo, pievienojot pareizo izejšķīduma daudzumu sterilam, destilētam ūdenim, rūpējoties, lai tas netiktu inficēts. Cietajām barotnēm pievieno 0,8 procentus agara.

Izejkultūra

Izejkultūras ir nelielas aļģu kultūras, ko regulāri pārnes svaigā barotnē izmantošanai par testa sākotnējo materiālu. Ja šīs kultūras neizmanto regulāri, tās svītrās uzsēj mēģenēs uz slīpagara. Tās pārnes uz svaigu barotni vismaz vienu reizi divos mēnešos.

Izejkultūras audzē koniskās kolbās, kas satur atbilstošo barotni (tilpums: apmēram 100 ml). Ja aļģes tiek inkubētas 20 °C temperatūrā ar nepārtrauktu apgaismojumu, pārnešanu nepieciešams veikt reizi nedēļā.

Pārnešanas laikā daļu "vecās" kultūras ar sterilām pipetēm pārnes kolbā ar svaigu barotni tā, lai strauji augošām sugām sākotnējā koncentrācija būtu apmēram 100 reižu mazāka nekā vecajā kultūrā.

Sugas augšanas ātrumu var noteikt, izmantojot augšanas līkni. Ja tā ir zināma, ir iespējams aplēst blīvumu, kuru sasniedzot, kultūra ir jāpārnes uz jauno barotni. Tas jāveic pirms kultūras bojāejas stadijas iestāšanās.

Priekškultūra

Priekškultūra ir paredzēta tāda aļģu daudzuma iegūšanai, kas piemērots testējamo kultūru inokulēšanai. Priekškultūru inkubē attiecīgā testa apstākļos un izmanto tās eksponenciālās augšanas fāzē, parasti pēc 2–4 dienu ilgas inkubācijas. Ja aļģu kultūras satur deformētas vai anormālas šūnas, tās izmantot nevar.

▼M6

5. papildinājums

Datu analīze, izmantojot nelineāru regresiju

Vispārīgi apsvērumi

Atbildreakcija aļģu testos un citos mikroorganismu augšanas testos – biomasas pieaugums – ir nepārtraukts vai metrisks mainīgais lielums – procesa ātrums, ja izmanto augšanas ātrumu, vai tā integrālis laikā, ja izmanto biomasu. Abi lielumi ir attiecināmi pret atbilstošo vidējo atbildreakciju kontrolgrupu replikātos, kas nav eksponēti un parāda maksimālo atbildreakciju radītajos apstākļos, kuros gaisma un temperatūra aļģu testēšanā ir primāri noteicošie faktori. Sistēma ir sadalīta vai homogēna, un biomasu var uzskatīt par nepārtrauktu masu, neņemot vērā atsevišķas šūnas. Šādas sistēmas atbildreakcijas dispersijas sadalījums ir saistīts tikai ar eksperimenta faktoriem (parasti tos raksturo kļūdu lognormāls vai normāls sadalījums). Tas atšķiras no parastajām biotestēšanasatbild reakcijām ar binārajiem datiem, kuru gadījumā atsevišķu organismu tolerance (parasti binomiāli sadalīta) bieži tiek uzskatīta par dominējošo dispersijas sastāvdaļu. Šajā gadījumā kontrolgrupas atbildreakcijas ir nulles vai fona līmenī.

Parasti normalizēta vai relatīva atbildreakcija r monotoni samazinās no 1 (nulles inhibīcija) līdz 0 (100 % inhibīcija). Jāievēro, ka ar katru atbildreakciju ir saistīta kļūda un ka šķietamu negatīvu inhibēšanos var aprēķināt tikai nejaušas kļūdas dēļ.

Regresijas analīze

Modeļi

Regresijas analīzes mērķis ir kvantitatīvi attēlot koncentrācijas–atbildreakcijas līkni matemātiskās regresijas funkcijas Y = f (C) veidā vai – visbiežāk – F(Z), kur Z = log C. Ja tā tiek lietota apgriezti $C = f^{-1}$ (Y), var aprēķināt EC_x vērtības, tostarp EC_{50}, EC_{10} un EC_{20}, un to 95 % ticamības robežas. Ir pierādījies, ka vairākas vienkāršas matemātiskas funkcijas sekmīgi var raksturot aļģu augšanas inhibēšanās testos iegūtās koncentrāciju un atbildreakciju sakarības. Šīs funkcijas ietver, piemēram, logistisko funkciju, nesimetrisko Veibula funkciju un lognormālā sadalījuma funkciju, kas veido sigmoidālās līknes, asimptotiski tuvojoties nullei pie C → 0 un vienam pie C → bezgalība.

Nepārtrauktu sliekšņa funkciju modeļu (piemēram, Koijmana *[Kooijman])* modelis "populācijas augšanas inhibēšanās aprēķinam", ko izstrādājis Koijmans *et el.* 1996. gadā) ir nesen piedāvāts modelis vai alternatīva asimptotiskajiem modeļiem. Šajā modelī tiek pieņemts, ka koncentrācijām nav ietekmes zem noteikta sliekšņa EC_0+, ko aplēš, ekstrapolējot koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību, lai šķērsotu koncentrācijas asi, izmantojot vienkāršu nepārtrauktu funkciju, kuru sākuma punktā nevar diferencēt.

Jāņem vērā, ka analīze var būt vienkārša atlikuma kvadrātu summas samazināšana (pieņemot pastāvīgu dispersiju) vai arī svērto kvadrātu summa, ja dispersijas heterogenitāte ir kompensēta.

Procedūra

Procedūra kopumā ir šāda. Jāatlasa piemērots funkcijas vienādojums Y = f(C) un jāievieto tajā dati, izmantojot nelineāro regresiju. Ieteicams izmantot mērījumus no katras kolbas, nevis replikātu vidējās vērtības, lai no datiem iegūtu pēc

▼M6

iespējas vairāk informācijas. Tomēr, ja dispersija ir liela, pieredze liecina, ka replikātu vidējās vērtības var sniegt noturīgākas matemātiskās aplēses, kuras mazāk ietekmē sistēmiskas kļūdas datos, kādas saglabājas, izmantojot katru atsevišķo datu punktu.

Grafiski attēlo piemeklēto līkni, attēlo izmērītos datus un pārbauda līknes atbilstību. Šim nolūkam īpaši noderīgs rīks var būt atlikumu analīze. Ja izvēlētā funkcionālā sakarība, kas atbilst koncentrācijai un atbildreakcijai, pietiekami labi neattēlo visu līkni vai kādu nozīmīgu tās daļu, piemēram, atbildreakciju pie zemām koncentrācijām, jāizvēlas cita līknes alternatīva, piemēram, simetriskās līknes vietā jāizvēlas nesimetriskā Veibula funkcija. Negatīva inhibēšanās var radīt problēmas, piemēram, ar log-normāla sadalījuma funkciju, un var būt jāizmanto alternatīva regresijas funkcija. Šādām negatīvām vērtībām nav ieteicams piešķirt nulles vai zemu pozitīvu vērtību, jo tas sagroza kļūdu sadalījumu. Lai aplēstu EC_{lowx}, dažas līknes daļas, piemēram, zemas inhibēšanās daļu, var būt pietderīgi piemeklēt atsevišķi. Izmantojot piemeklēto vienādojumu (ar "apgriezto aplēšanu", $C = f^{-1}(Y)$), aprēķina EC_x raksturīgās punktvērtības, un testēšanas pārskatā norāda vismaz aplēsto EC_{50} un vienu vai divas aplēstās $EC_{low\ x}$ vērtības. Veiktajos testos iegūtā pieredze liek secināt, ka aļģu testa precizitāte parasti ļauj pietiekami pareizi aplēst vērtības pie 10 % inhibīcijas, ja datu punktu skaits ir pietiekams, – izņemot gadījumus, kad zemas koncentrācijas stimulē augšanu, līdz ar to darbojoties kā maldinošs faktors. EC_{20} aplēses bieži vien ir precīzākas nekā EC_{10} aplēses, jo EC_{20} parasti atrodas aptuveni centrālās koncentrācijas–atbildreakcijas līknes lineārajā daļā. Dažkārt augšanas stimulēšanas dēļ ir grūti interpretēt EC_{10}. Tāpēc, kaut arī EC_{10} parasti var noteikt ar pietiekamu pareizību, ir ieteicams pārskatā ietvert arī EC_{20}.

Svēruma koeficienti

Eksperimenta dispersija parasti nav konstanta, un tā tipiski ietver proporcionalitātes elementu, tāpēc parasti izdevīgāk ir veikt svērto regresiju. Šajā analīzē parasti pieņem dispersijai apgriezti proporcionālus svēruma koeficientus:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Daudzas regresijas programmas ļauj veikt svērto regresijas analīzi ar tabulā norādītiem svēruma koeficientiem. Ērtības labad svēruma koeficienti jānormalizē, tos reizinot ar $n/\Sigma\ w_i$ (n ir datu punktu skaits), lai to summa būtu viens.

Atbildreakciju normalizēšana

Normalizēšana pēc kontrolgrupas vidējās atbildreakcijas rada dažas principiālas problēmas un diezgan komplicētu dispersijas struktūru. Dalot atbildreakcijas ar vidējo kontrolgrupas atbildreakciju inhibīcijas procentuālās vērtības iegūšanai, tiek ieviesta papildu kļūda, ko rada kontrolgrupas vidējās vērtības kļūda. Ja vien šī kļūda nav nenozīmīgi maza, svēruma koeficienti regresijā un ticamības robežās ir jākoriģē, lai tie kovariētu ar kontrolgrupu (Dreipers un Smits *[Draper and Smith]*, 1981). Jāievēro, ka kontrolgrupas vidējai atbildreakcijai ir jābūt aplēstai precīzi, lai līdz minimumam samazinātu relatīvās atbildreakcijas kopējo dispersiju. Šī dispersija ir šāda:

(apakšējais indekss i attiecas uz koncentrācijas līmeni i, bet apakšējais indekss 0 – uz kontrolgrupām)

$$Yi = \text{relatīvā atbildreakcija} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

ar dispersiju $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

$(\partial\ Y_i/ \partial\ r_i) = 1/r_0$ un $(\partial\ Y_i/ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$,

ar datiem, kas atbilst normālajam sadalījumam m_i un m_0 replikātiem: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$,

tādējādi kopējā relatīvā atbildreakcijas Y_i dispersija ir

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^2 \cdot m_0$$

Kontrolgrupas vidējās vērtības kļūda ir apgriezti proporcionāla kontrolreplikātu vidējā skaita kvadrātsaknei, un dažreiz ir pamatoti iekļaut vēsturiskos datus, tādējādi būtiski samazinot kļūdu. Alternatīva procedūra ir neveikt datu normalizēšanu, bet gan pielāgot absolūtās atbildreakcijas, tostarp kontrolgrupas atbildreakcijas datus, bet kontrolgrupas atbildreakcijas vērtību ieviešot kā papildu parametru piemeklēšanai ar nelineāro regresiju. Atšķirībā no parastā divu parametru regresijas vienādojuma, šai metodei jāpiemeklē trīs parametri, tāpēc nepieciešams vairāk datu punktu nekā nelineārajai regresijai, kurā izmantoti dati, kas normalizēti, izmantojot iepriekš noteiktu kontrolgrupas atbildreakciju.

Ticamības intervālu apgrieztās vērtības

Nelineāras regresijas ticamības intervālu aprēķināšana, izmantojot apgriezto aplēšanu, ir diezgan sarežģīta un nav pieejama parastajās datorprogrammu paketēs, ko izmanto statistisko aprēķinu veikšanai. Aptuvenās ticamības robežas nosaka, izmantojot standarta nelineārās regresijas programmas ar atkārtotu parametrizāciju (Brūss [*Bruce]* un Ferštēgs *[Versteeg]*, 1992), kas ietver matemātisko vienādojumu pārveidošanu, izmantojot vēlamās punktu vērtības, piemēram, EC_{10} un EC_{50} par aplēšamajiem parametriem. (Šī funkcija ir I = f (α, β, koncentrācija), un nepieciešams izmantot definīcijas sakarības f (α, β, EC_{10}) = 0,1 un f (α, β, EC_{50}) = 0,5, lai f (α, β, koncentrācija) aizstātu ar ekvivalentu funkciju g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrācija).

Tiešāku aprēķinu (Andersens *et al.* (*Andersen et al*), 1998) veic, izmantojot sākotnējo vienādojumu kopā ar Teilora ekspansiju ap vidējām r_i un r_0 vērtībām.

Nesen popularitāti ir ieguvušas "bootstrap" metodes. Šajās metodēs dispersijas empīriskā sadalījuma aplēšanai izmanto mērījumu datus un biežu atkārtotu paraugu ņemšanu, kam izmanto nejaušo skaitļu ģeneratoru.

ATSAUCES

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D. and Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. "VIEGLAS" BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJAS NOTEIKŠANA

I DAĻA. **VISPĀRĪGI APSVĒRUMI**

I.1. IEVADS

Aprakstītas sešas testēšanas metodes ķīmisko vielu bioloģiskās vieglas noārdīšanās spējas novērtēšanai aerobos apstākļos ūdens vidē:

a) izšķīdušā organiskā oglekļa (IOO) noteikšana. Atkrāsošanās (C.4.-A metode);

b) modificētā ESAO metode – IOO atkrāsošanās (C.4.-B metode);

c) oglekļa dioksīda (CO_2) izdalīšanās (modificēta Sturma metode) (C.4.-C metode);

d) manometriskā respirometrija (C.4.-D metode);

e) slēgto pudeļu (C.4.-E metode);

f) *MITI* (Japānas Ārējās tirdzniecības un rūpniecības ministrijas metode) (C.4.-F metode).

Par visām sešām metodēm to izmantošanas vispārīgie un kopīgie apsvērumi izklāstīti attiecīgās metodes I daļā. Konkrētie jautājumi, kas attiecas uz katru metodi atsevišķi, aprakstīti II līdz VII daļā. Papildinājumos pievienotas definīcijas, formulas un norādījumi.

Pēc šīm metodēm iegūst salīdzināmus rezultātus, par ko liecina ESAO 1988. gadā veiktās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti. Tomēr atkarībā no testējamās vielas fizikālajām īpašībām kādai no metodēm var būt dodama priekšroka.

I.2. PIEMĒROTĀKĀS METODES IZVĒLE

Lai izraudzītos piemērotāko metodi, ir svarīgi iegūt informāciju par attiecīgās vielas šķīdību, tvaika spiedienu un adsorbcijas īpašībām. Teorētisko vērtību aprēķināšanai un izmērīto parametru vērtību pārbaudei, piemēram, TSP, TCO_2, IOO, TOC, ĶSP (skatīt 1. un 2. papildinājumu), jāzina vielas ķīmiskā struktūra vai sastāvs.

Ķīmiskās vielas, kuru šķīdība ūdenī ir vismaz 100 mg/l, ja tās nav gaistošas un neadsorbējas, var novērtēt pēc visām metodēm. Vielām, kuras slikti šķīst ūdenī, ir gaistošas vai adsorbējas, piemērotākās metodes norādītas 1. tabulā. Kā pārbaudīt ūdenī slikti šķīstošas vielas un gaistošas vielas, aprakstīts 3 papildinājumā. Vielas ar vidēju gaistamību var pārbaudīt pēc IOO atkrāsošanās metodes, ja testēšanas traukos (kuriem jābūt noslēdzamiem ar piemērotiem līdzekļiem) ir pietiekams tilpums gāzēm. Šādā gadījumā fizisko zudumu noteikšanai jāizveido abiotiska kontrole.

▼B

1.tabula

Testēšanas metožu piemērotība

Tests	Analīzes metode	Piemērotība vielām, kuras ir:		
		slikti šķīstošas	gaistošas	adsorbējas
IOO atkrāsošanas	izšķīdušais organiskais ogleklis	—	—	+/-
Modif. ESAO atkrāsošanās metode	izšķīdušais organiskais ogleklis	—	—	+/-
CO_2 izdalīšanās	respirometrija: CO_2 izdalīšanās	+	—	+
Manometriskā respirometrija	manometriskā respirometrija: skābekļa patēriņš	+	+/-	+
Slēgto pudeļu	respirometrija: izšķīdušais skābeklis	+/-	+	+
MITI	respirometrija: skābekļa patēriņš	+	+/-	+

Iegūto rezultātu interpretēšanai vajadzīga informācija par testējamā materiāla tīrību vai galveno sastāvdaļu saturu, īpaši gadījumos, kad rezultātu skaitliskās vērtības ir nelielas vai minimālas.

Piemērotāko pārbaudāmo koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par pārbaudāmās vielas toksisko iedarbību uz baktērijām (4. papildinājums), un tā var būt ļoti svarīga bioloģiskās degradācijas spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

I.3. STANDARTVIELAS

Procedūras pārbaudei paralēli parastajām testējamo vielu pārbaužu sērijām veic izmēģinājumus ar standartvielām, kuras atbilst vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas kritērijiem.

Piemērotas standartvielas ir anilīns (svaigi pārdestilēts), nātrija acetāts un nātrija benzoāts. Minētās standartvielas pēc šīm metodēm noārdās pat tad, ja netiek pievienots sējmateriāls.

Izteikts priekšlikums atrast tādu standartvielu, kura gan ir viegli bioloģiski noārdāma, taču šim nolūkam ir noteikti nepieciešams pievienot sējmateriālu. Tāpēc tika ieteikts izmantot kālija hidrogēnftalātu, taču, pirms šo vielu var pieņemt par standartvielu, par to ir jāiegūst vairāk attiecīgas informācijas.

Respirometriskos mērījumos skābekļa uzņemšanu nitrifikācijas dēļ var ietekmēt slāpekli saturoši savienojumi (skatīt 2. un 5. papildinājumu).

I.4. NOTEIKŠANAS METOŽU PRINCIPS

Testējamās vielas šķīdumu vai suspensiju minerālbarotnē inokulē un inkubē aerobos apstākļos tumsā vai izkliedētā gaismā. Ar sējmateriālu saistītais izšķīdušais organiskais ogleklis (IOO) jāuztur iespējami zemā līmenī salīdzinājumā ar IOO no testējamās vielas. Izdara sējmateriāla endogenās aktivitātes korekciju, paralēli veicot izmēģinājumus ar tukšo paraugu ar sējmateriālu, bet bez pārbaudāmās vielas, lai gan šūnu endogenā aktivitāte vielas klātbūtnē precīzi neatbilst aktivitātei endogenajā kontrolē. Paralēli veiktspējas pārbaudei veic testēšanu, izmantojot standartvielu.

▼B

Parasti degradācija notiek pēc tādu parametru kā IOO, CO_2 veidošana un skābekļa uzņemšana, un, lai noteiktu biodegradācijas sākumu un beigas, mērījumus veic pietiekami bieži. Ar automātiskajiem respirometriem mērījumus veic nepārtraukti. Dažkārt papildus citiem parametriem papildus nosaka IOO, bet parasti to dara tikai testēšanas sākumā un beigās. Īpašas ķīmiskās analīzes var veikt pārbaudāmās vielas primārās degradācijas novērtēšanai un lai noteiktu tās laikā veidojošos starpproduktu koncentrāciju (obligāti jāveic pēc *MITI* metodes).

Parasti izmēģinājumi ilgst 28 dienas. Tomēr to var izbeigt arī drīzāk nekā pēc 28 dienām, piemēram, tiklīdz biodegradācijas līkne sasniegusi plato vismaz trīs analīzēs. Izmēģinājumus var turpināt arī ilgāk nekā 28 dienas, ja līkne liecina par to, ka biodegradācija ir sākusies, taču 28 dienu laikā nav sasniegts tās plato.

I.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

I.5.1. **Reproducējamība**

Biodegradācijas īpatnību dēļ un gadījumos, kad par sējmateriālu tiek izmantotas jauktas baktēriju populācijas, noteikšana jāveic vismaz divos atkārtojumos.

Parasti, jo augstāka ir sākotnēji pievienoto mikroorganismu koncentrācija, jo mazākas ir atšķirības starp atkārtojumiem. Veiktās starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti liecina arī, ka dažādās laboratorijās iegūtie rezultāti var būt ievērojami atšķirīgi, taču laba sakritība tiek iegūta ar vielām, kas viegli bioloģiski noārdās.

I.5.2. **Testa rezultātu derīgums**

Izmēģinājuma rezultāti uzskatāmi par derīgiem, ja atkārtojumos iegūto rezultātu maksimālo vērtību starpība pēc vielas izdalīšanas plato izmēģinājuma beigās vai 10 dienu intervāla beigās attiecīgi nepārsniedz 20 % un ja standartvielas degradācijas procents sasniedzis vieglas bioloģiskās noārdīšanas spējai vajadzīgo līmeni 14 dienu laikā. Ja kāds no šiem nosacījumiem nav ievērots, noteikšana jāveic atkārtoti. Metožu stingrības dēļ zemas noteiktās vērtības nebūt nenozīmē, ka testējamā viela vides apstākļos bioloģiski nenoārdās, tomēr liecina, ka biodegradācijas noteikšanai jāveic papildu darbs.

Ja toksiskuma izmēģinājumos ar testējamo vielu un standartvielu degradācijas pakāpe (pēc TOC) nepārsniedz 35 % vai ir mazāka par 25 % (pēc TSP vai TCO_2) 14 dienu laikā, uzskata, ka pārbaudāmajām ķīmiskajām vielām ir inhibējošas īpašības (skatīt arī 4. papildinājumu). Testēšana jāatkārto, ja iespējams izmantot pārbaudāmo vielu zemākā koncentrācijā un/vai sējmateriālu augstākā koncentrācijā, bet ne vairāk kā 30 mg cietvielu daļiņu litrā.

I.6. VISPĀRĪGAS PROCEDŪRAS UN SAGATAVOŠANA

Vispārīgi noteikumi par izmēģinājumu veikšanu apkopoti 2. tabulā. Aparatūra un citi eksperimentālie apstākļi, kas konkrēti attiecas uz katru metodi, aprakstīti turpmāk attiecīgajās iedaļās.

▼B

1. tabula

Pārbaudes apstākļi

Tests	IOO atkrāsošanas	CO_2 izdalīšanās	Manometriskā respirometrija	Modificētā ESAO skrīninga	Slēgto pudeļu	MITI (I)
Testējamās vielas koncentrācija						
mg/l			100		2–10	100
mg IOO/l	10–40	10–20		10–40		
mg TSP/l			50–100		5–10	
Sējmateriāla koncentrācija (šūnu/l, aptuveni)	≤ 30 mg/l SS vai ≤ 100ml efluenta/l (10^7–10^8)			0,5ml sekundārā efluenta/l (10^5)	≤ 5 ml efluenta/l (10^4–10^6)	30 mg/l SS (10^7–10^8)
Elementu koncentrācija minerālbarotnē (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					vēlams 7,0
Temperatūra	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

IOO = izšķīdušais organiskais ogleklis TSP = teorētiskais skābekļa patēriņš SS = suspendētās daļiņas

I.6.1. **Ūdens atšķaidīšanai**

Izmanto dejonizētu vai destilētu ūdeni, kas augšanu kavējošās koncentrācijās nesatur toksiskas vielas (piemēram, Cu++ jonus). Tajā nedrīkst būt vairāk par 10 % organiskā oglekļa no daudzuma, kas tiek ievadīts ar pārbaudāmo vielu. Ūdenim jābūt ļoti tīram, lai nebūtu lielas tukšajam paraugam noteiktās vērtības. Kontamināciju var radīt gan raksturīgi piemaisījumi, jonu apmaiņas sveķi, gan arī baktēriju un aļģu sadalīšanās produkti. Katrai izmēģinājumu sērijai izmanto ūdeni no vienas partijas, kas iepriekš pārbaudīts, veicot IOO analīzi. Šāda pārbaude nav vajadzīga noslēgto pudeļu testam, taču tad ūdenim jābūt ar zemu skābekļa patēriņu.

▼B

I.6.2. **Minerālvielu rezerves šķīdumi**

Testējamos šķīdumus pagatavo, no iepriekš sagatavotiem minerālvielu rezerves šķīdumiem. Var izmantot šādus rezerves šķīdumus (ar dažādiem atšķaidījuma koeficientiem) IOO atkrāsošanas, modificētajai ESAO skrīninga, CO_2 izdalīšanās, manometriskās respirometrijas, slēgto pudeļu metodēm.

Atšķaidījuma koeficienti un minerālbarotnes *MITI* metodei norādīti pie attiecīgajām metodēm.

Rezerves šķīdumi:

No analītiski tīriem reaģentiem pagatavo šādus rezerves šķīdumus:

a) Monokālija dihidrogēnortofosfāts, KH_2PO_4 8,50 g

Dikālija monohidrogēnortofosfāts, K_2HPO_4 21,75 g

Dinātrija monohidrogēnortofosfāta dihidrāts $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

Amonija hlorīds, NH_4Cl 0,50 g

Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram. Šķīduma pH jābūt 7,4.

b) Kalcija hlorīds, bezūdens, $CaCl_2$ 27,50 g

vai kalcija hlorīda dihidrāts, $CaCl_2, 2 H_2O$ 36,40 g

Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram

c) Magnija sulfāta heptahidrāts, $MgSO_4 . 7 H_2O$ 22,50 g

Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

d) Dzelzs(III) hlorīda heksahidrāts, $FeC1_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.

Piezīme: lai šķīdums nebūtu jāgatavo tieši pirms lietošanas, uz tā vienu litru pievieno vienu pilienu konc. HCl vai 0,4 g etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls (EDTA).

I.6.3. **Ķīmisko vielu rezerves šķīdumi**

Piemēram, izšķīdina 1 līdz 10 g pārbaudāmās vielas vai standartvielas dejonizētā ūdenī un atšķaida līdz vienam litram, ja šķīdība ir lielāka par 1 g/l. Rezerves šķīdumus var pagatavot minerālbarotnē vai pievienot vielu tieši barotnei. Par mazāk šķīstošām vielām skatīt 3. papildinājumu, bet *MITI* metodē (C.4.-F metode) neizmanto nekādus šķīdinātājus vai emulgatorus.

▼B

I.6.4. **Sējmateriāls**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām, (nehlorētiem) attīrītiem notekūdeņiem, virszemes ūdeņiem, augsnes vai minēto materiālu maisījuma. Ja izmanto aktīvās dūņas IOO atkrāsošanās metodei, CO_2 izdalīšanās metodei un manometriskajām respirometrijas metodēm, tās jāņem no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas ierīces, uz kurām galvenokārt novada sadzīves notekūdeņus. Noskaidrots, ka, izmantojot citu sējmateriālu, rezultātiem ir lielāka izkliede. Modificētajai ESAO metodei un slēgto pudeļu metodei vajadzīgs vairāk atšķaidīts sējmateriāls bez aktīvo dūņu daļiņām, tāpēc tā piemērotākais avots ir attīrīti notekūdeņi no sadzīves notekūdeņu attīrīšanas iekārtas vai attiecīgas laboratorijas iekārtas. *MITI* metodei sējmateriāls ir maisījums no dažādiem avotiem, un metodes aprakstā tas aprakstīts atsevišķā iedaļā.

I.6.4.1. *Sējmateriāls no aktīvajām dūņām*

Ņem svaigu aktīvo dūņu paraugu no aerācijas tvertnes notekūdeņu attīrīšanas iekārtās vai laboratorijas iekārtās, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Ja vajadzīgs, atdala rupjās daļiņas, filtrējot caur smalku sietu, un pēc tam dūņas glabā aerobos apstākļos.

Pēc rupjo daļiņu atdalīšanas nostādina vai centrifugē (piemēram, 10 min pie 100 g). Dzidro šķīdumu izlej. Dūņas var skalot ar minerālbarotni. Koncentrētās dūņas suspendē minerālbarotnē, lai iegūtu suspendēto daļiņu koncentrāciju 3–5 g suspendēto daļiņu/l un līdz lietošanai aerē.

Dūņas jāņem no parastām attīrīšanas iekārtām, kas darbojas pienācīgi. Ja dūņas jāņem no attīrīšanas iekārtām, kas darbojas ar pilnu jaudu, vai tās var saturēt inhibitorus, tās ir jāmazgā. Pēc rūpīgas sajaukšanas atkārtoti suspendētās dūņas nostādina vai centrifugē, dzidro šķīdumu nolej un izmazgātās nogulsnes suspendē minerālbarotnē. Šo procedūru atkārto, līdz dūņas uzskatāmas par attīrītām no substrāta pārākuma vai inhibitora.

Pēc dūņu attīrīšanas vai arī no neattīrītām dūņām ņem paraugu tieši pirms lietošanas suspendēto daļiņu satura noteikšanai.

Otra alternatīva ir aktīvās dūņas homogenizēt (3–5 g suspendēto daļiņu/l). Dūņas mehāniskajā maisītājā 2 min sajauc ar vidēju ātrumu. Sajauktās dūņas 30 min vai, ja vajadzīgs, ilgāk nostādina un šķidrumu dekantē izmantošanai par sējmateriālu 10 ml/l minerālbarotnes.

I.6.4.2. *Citi sējmateriāla avoti*

To var iegūt no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Ņem svaigu paraugu un transportēšanas laikā tur aerobos apstākļos. Nostādina vienu stundu vai filtrē caur papīra filtru ar rupjām porām, un dekantātu vai filtrātu līdz lietošanai glabā aerobos apstākļos. Uz litru barotnes izmanto līdz 100 ml šāda sējmateriāla.

▼B

Vēl cits sējmateriāla avots ir virszemes ūdeņi. Šādā gadījumā ņem piemērota virszemes ūdens paraugu, piemēram, upes vai ezera ūdeni, un līdz lietošanai glabā aerobos apstākļos. Ja vajadzīgs, sējmateriālu koncentrē filtrējot vai centrifugējot.

I.6.5. **Sējmateriāla iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iepriekš kondicionēt, bet ne pieradināt eksperimenta apstākļiem. Kondicionēšanu veic, aktīvās dūņas aerējot minerālbarotnē vai attīrītā notekūdenī 5–7 dienas izmēģinājuma vides temperatūrā. Iepriekšēja kondicionēšana dažkārt uzlabo noteikšanas metožu precizitāti, samazinot tukšajam paraugam noteiktās vērtības. Neuzskata par nepieciešamu kondicionēt sējmateriālu, veicot noteikšanu pēc *MITI* metodes.

I.6.6. **Abiotiskā kontrole**

Vajadzības gadījumos pārbauda testējamās vielas iespējamo abiotisko degradāciju, nosakot izdalīto IOO, skābekļa uzņemšanu vai oglekļa dioksīda izdalīšanos sterilā kontrolē bez sējmateriāla. Sterilizē ar membrānfiltrāciju (0,2-0,45 mikrometri) vai vajadzīgajā koncentrācijā pievienojot piemērotu toksisku vielu. Ja izmanto membrānfiltrāciju, sterilitātes saglabāšanai paraugus ņem aseptiskos apstākļos. Ja iespējama pārbaudāmās vielas adsorbcija, bioloģiskās noārdīšanās spēju nosakot pēc IOO izdalīšanās, īpaši tad, ja par sējmateriālu izmanto aktīvās dūņas, jāiekļauj arī abiotiskā kontrole ar sējmateriālu, kas ir noindēts.

I.6.7. **Kolbu skaits**

Izmēģinājumu sērijai parasti izmantojamo kolbu skaits noteikts katras metodes aprakstā.

Var izmantot šādas kolbas:

— testa suspensija: satur testējamo vielu un sējmateriālu,

— sējmateriāla tukšais paraugs: satur tikai sējmateriālu,

— noteikšanas kontrole: satur standartvielu un sējmateriālu,

— abiotiskā sterilā kontrole: sterila, satur pārbaudāmo vielu (skatīt I.6.6. punktu),

— adsorbcijas kontrole: satur pārbaudāmo vielu, sējmateriālu un sterilizējošo vielu,

— toksicitātes kontrole: satur testējamo vielu, standartvielu un sējmateriālu.

Paralēli noteikti jānosaka testa suspensija un sējmateriāla tukšais paraugs. Ieteicams paralēli veikt noteikšanu arī citās kolbās.

Tomēr tas ne vienmēr ir iespējams. Jānodrošina, ka paraugs ir tik liels, lai varētu veikt noteikšanu vai nolasījumus 10 dienu intervālā.

▼B

I.7. DATI UN IZVĒRTĒŠANA

Aprēķinot degradācijas procentu D_t, izmanto attiecīgā parametra vidējās vērtības, kas noteiktas pēc diviem atkārtojumiem testa suspensijai un sējmateriāla tukšajam paraugam. Formulas dotas turpmāk attiecīgo metožu aprakstos. Degradācijas procesu attēlo grafiski un norāda 10 dienu intervālu. Aprēķina izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās vai vajadzības gadījumā vērtību, kādu sasniedz noteikšanas beigās.

Respirometriskos mērījumos skābekļa uzņemšanu nitrifikācijas dēļ var ietekmēt slāpekli saturoši savienojumi (skatīt 2. un 5. papildinājumu).

I.7.1. **Degradācija, ko mēra, nosakot IOO**

Degradācijas procentu D_t katram parauga ņemšanas laikam aprēķina atsevišķi kolbām ar testējamo vielu, izmantojot IOO mērījumu vidējās vērtības, kuras noteiktas pēc diviem atkārtojumiem, lai varētu novērtēt testa derīgumu (skatīt I.5.2. punktu). To aprēķina pēc šāda vienādojuma:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

kur:

D_t = degradācijas % laikā t,

C_o = IOO vidējā sākuma koncentrācija barotnē ar sējmateriālu, kas satur testējamo vielu (mg IOO/1),

C_t = IOO vidējā koncentrācija barotnē ar sējmateriālu, kas satur testējamo vielu laikā t (mg IOO/1),

C_{bo} = IOO vidējā sākuma koncentrācija tukšajā paraugā ar sējmateriālu minerālbarotnē (mg IOO/l),

C_{bt} = IOO vidējā koncentrācija tukšajā paraugā ar sējmateriālu minerālbarotnē laikā t (mg IOO/1).

Visas koncentrācijas nosaka eksperimentāli.

I.7.2. **Degradācija, ko mēra ar īpašām analīzēm**

Ja ir pieejami īpaši analītiskie dati, aprēķina primāro biodegradāciju no:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kur:

D_t = degradācijas % laikā t, parasti 28 dienās,

S_a = testējamās vielas atlikušais daudzums barotnē ar sējmateriālu noteikšanas beigās (mg),

S_b = testējamās vielas atlikušais daudzums tukšajā paraugā ar ūdeni/barotni, kam pievienota tikai testējamā viela (mg).

▼B

1.7.3. **Abiotiskā degradācija**

Gadījumos, kad izmanto abiotisko sterilo kontroli, aprēķina abiotiskās degradācijas procentu pēc formulas:

$$\% \text{ abiotiskā degradācija} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kur:

$C_{s(o)}$ = IOO koncentrācija sterilajā kontrolē 0. dienā,

$C_{s(t)}$ = IOO koncentrācija sterilajā kontrolē t dienā.

I.8. PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā, ja iespējams, jānorāda:

— nosakāmā viela, standartvielas, to tīrība,

— testēšanas apstākļi,

— sējmateriāls: īpašības un ņemšanas vieta(-as), koncentrācija un iepriekšēja kondicionēšana, ja tā veikta,

— rūpniecisko notekūdeņu sastāvs un daļa notekūdeņos, ja tie zināmi,

— testēšanas ilgums un temperatūra,

— par grūti šķīstošam vielām to apstrāde,

— izmantotā testēšanas metode; par visām noteikšanas procedūru izmaiņām jādod zinātnisks pamatojums,

— drošības datu lapa,

— novērotās inhibēšanas parādības,

— novērotā abiotiskā degradācija,

— ķīmisko analīžu dati, ja ir pieejami,

— starpproduktu analīžu dati, ja pieejami,

— degradācijas procents atkarībā no laika testējamajai vielai un standartvielai diagrammas veidā; precīzi jānorāda kavējuma fāze, degradācijas fāze, 10 dienu intervāls un virziena koeficients (1. papildinājums). Ja tests veikts saskaņā ar derīguma kritērijiem, degradācijas procenta vidējās vērtības kolbām ar pārbaudāmo vielu var izmantot attēlošanai,

— izdalīšanās procents pēc 10 dienu intervāla, sasniedzot plato vai testēšanas beigās.

II DAĻA. IOO ATKRĀSOŠANĀS TESTS (C.4.-A metode)

II.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes ar sējmateriālu, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10–40 mg IOO/l) 22 ± 2 °C temperatūrā aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā.

▼B

Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic biežas IOO analīzes. Biodegradācijas pakāpi aprēķina pēc izdalītā IOO koncentrācijas (kas koriģēta pēc sējmateriāla tukšā parauga kontroles), ko izsaka procentos attiecībā pret sākuma koncentrāciju. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildu ķīmisko analīžu rezultātiem.

II.2. TESTA METODES APRAKSTS

II.2.1. **Iekārta**

a) Koniskās kolbas, piemēram, 250 ml līdz 2 l tilpuma, atkarībā no IOO analīzei vajadzīgā tilpuma;

b) mehāniskais kratītājs koniskajām kolbām, ar automātisku temperatūras regulēšanu vai izmantošanai pastāvīgā telpas temperatūrā, ar pietiekamu jaudu aerobu apstākļu uzturēšanai visās kolbās;

c) filtrēšanas iekārta ar piemērotām membrānām;

d) IOO analizators;

e) aparāts izšķīdušā skābekļa noteikšanai;

f) centrifūga.

II.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu skatīt I.6.2. punktā.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1 l ar ūdeni atšķaidīšanai.

II.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem; augsnēm vai iepriekšminēto maisījuma.

Skatīt I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

II.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēram, 2 l tilpuma koniskajās kolbās pārnes pa 800 ml minerālbarotnes un pievieno pietiekamus tilpumus testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumu atsevišķās kolbās, lai iegūtu ķīmisko vielu koncentrāciju, kas ekvivalenta 10–40 mg IOO/l. Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4. Kolbās iesēj aktīvās dūņas vai sējmateriālu no cita avota (skatīt I.6.4. punktu), lai iegūtu galīgo koncentrāciju, kas nepārsniedz 30 mg suspendēto daļiņu/l. Sagatavo arī sējmateriāla kontroli minerālbarotnē bez testējamās vielas vai standartvielas.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto testējamās vielas iespējamās inhibitora iedarbības pārbaudei, apsējot šķīdumu, kurā minerālbarotnē ir salīdzināmas testējamās vielas un standartvielas koncentrācijas.

Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (skatīt I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiskā degradācija.

▼B

Ja testējamā viela varētu tikt ievērojamā daudzumā adsorbēta uz stikla, dūņām u. c., papildus veic orientējošu novērtējumu, lai noteiktu iespējamo adsorbcijas pakāpi un tādējādi testa piemērotību konkrētajai vielai (skatīt 1. tabulu). Vienā kolbā, kas satur testējamo vielu, pievieno sējmateriālu un sterilizējošu vielu.

Visās kolbās uzpilda kopējo tilpumu līdz 1 l ar minerālbarotni un pēc samaisīšanas no katras kolbas ņem paraugu IOO sākuma koncentrācijas noteikšanai (skatīt 2.4. papildinājumu). Kolbas noslēdz, piemēram, ar alumīnija foliju tā, lai notiktu kolbas satura gaisa apmaiņa ar apkārtējo atmosfēru. tad kolbas ievieto kratītājā un sāk testēšanu.

II.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: testa suspensija

3. un 4. kolba: sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: noteikšanas kontrole

Vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: adsorbcijas kontrole

8. kolba: toksicitātes kontrole

Skatīt arī I.6.7. punktu.

II.2.6. **Darba gaita**

Visā testēšanas laikā divos atkārtojumos katrā kolbā nosaka IOO koncentrācijas pēc noteiktiem intervāliem pietiekami bieži, lai varētu noteikt 10 dienu intervāla sākumu un izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās. Katrai noteikšanai ņem minimāli nepieciešamo suspensijas daudzumu.

Pirms paraugu ņemšanas, ja vajadzīgs, kompensē iztvaikošanas zudumus, vajadzīgajā daudzumā pievienojot ūdeni atšķaidīšanai (skatīt I.6.1. punktu). Barotni pirms parauga ņemšanas rūpīgi samaisa un raugās, lai kolbu sienām pielipušais materiāls tiktu izšķīdināts vai suspendēts. Paraugu tūlīt filtrē caur membrānfiltru vai centrifugē (skatīt 2.4. papildinājumu). Ja filtrētos vai centrifugētos paraugus neanalizē tajā paša dienā, 2–4 ^{o}C temperatūrā tos var glabāt līdz 48 stundām, bet –18 ^{o}C un zemākā temperatūrā – arī ilgāku laiku.

II.3. DATI UN PĀRSKATS

II.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Saskaņā ar I.7.1. punktu (IOO noteikšana) aprēķina degradācijas procentu laikā t un fakultatīvi arī saskaņā ar I.7.2. punktu (īpašas analīzes).

Visus rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

▼B

II.3.2. **Rezultātu derīgums**

Skatīt I.5.2. punktu.

II.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu.

II.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

IOO ATKRĀSOŠANĀS TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, t_0: mg/l vielas veidā

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/l

5. **OGLEKĻA NOTEIKŠANA**

Oglekļa analizators:

	Kolbas Nr.		IOO pēc n dienām (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testējamā viela plus sējmateriāls	1	a_1					
		a_2					
		a, vid. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vid. $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolbas Nr.		IOO pēc n dienām (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Sējmateriāla tukšais paraugs bez testējamās vielas	3	c_1					
		c_2					
		c, vid. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vid. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **IZEJAS DATU NOVĒRTĒŠANA**

Kolbas nr.		degradācijas % pēc n dienām				
		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				
Vidējā vērtība (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

7. **ABIOTISKĀ KONTROLE** (fakultatīvi)

	Laiks (dienas)	
	0	t
IOO konc. (mg/l) sterilajā kontrolē	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFISKAS ĶĪMISKĀS ANALĪZES** (fakultatīvi)

	Testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	Primārā degradācija (%)
Sterilā kontrole	S_b	

▼B

	Testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	Primārā degradācija (%)
Testa barotne ar sējmateriālu	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III DAĻA. **MODIFICĒTĀ ESAO SKRĪNINGA METODE** (C.4.-B metode)

III.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10–40 mg IOO/l) apsēj ar 0,5 ml attīrītu notekūdeņu uz litru barotnes. Maisījumu aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā 22 ± 2 °C temperatūrā.

Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic biežas IOO analīzes. Biodegradācijas pakāpi aprēķina pēc izdalītā IOO koncentrācijas (ko koriģē pēc sējmateriāla tukšā parauga kontroles), ko izsaka procentos attiecībā pret sākuma koncentrāciju. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc papildus inkubācijas sākumā un beigās veikto papildus ķīmisko analīžu rezultātiem.

III.2. TESTA METODES APRAKSTS

III.2.1. Aprīkojums

a) Koniskās kolbas, piemēram, no 250 ml līdz 2 l tilpuma, atkarībā no IOO analīzei vajadzīgā tilpuma;

b) mehāniskais kratītājs koniskajām kolbām, ar automātisku temperatūras regulēšanu vai izmantošanai pastāvīgā telpas temperatūrā, ar pietiekamu jaudu aerobu apstākļu uzturēšanai visās kolbās;

c) filtrēšanas iekārta ar piemērotām membrānām;

d) IOO analizators;

e) aparāts izšķīdušā skābekļa noteikšanai;

f) centrifūga.

III.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu skatīt I.6.2. punktu.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 80 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1 litram ar ūdeni atšķaidīšanai.

Pēc šīs metodes par sējmateriālu izmanto tikai 0,5 ml attīrītu notekūdeņu/l, un tāpēc barotne var būt jāpastiprina ar mikroelementiem un augšanas stimulatoriem. To dara, uz litru gatavas barotnes pievienojot pa 1 ml šādu šķīdumu:

▼B

Mikroelementu šķīdums:

Mangāna sulfāta tetrahidrāts, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borskābe, H_3BO_3	57,2 mg
Cinka sulfāta heptahidrāts, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Amonija heptamolibdāts $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe helāts ($FeCl_3$ ethilēndiamīntetraetiķskābe)	100,0 mg
Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 000 ml	
Vitamīnu šķīdums:	
Rauga ekstrakts	15,0 mg

Rauga ekstraktu izšķīdina 100 ml ūdens. Sterilizē, filtrējot caur 0,2 mikronu membrānas filtru, vai gatavo svaigu.

III.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

To var iegūt no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Skatīt I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

Izmanto 0,5 ml uz litru barotnes.

III.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēram, 2 l tilpuma koniskajās kolbās pārnes pa 800 ml minerālbarotnes un pievieno pietiekamus tilpumus testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumu atsevišķās kolbās, lai iegūtu ķīmisko vielu koncentrāciju, kas ekvivalenta 10–40 mg IOO/1. Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4. Kolbas apsēj ar attīrītiem notekūdeņiem 0,5 ml/l (skatīt I.6.4.2. punktu). Sagatavo arī sējmateriāla kontroli minerālbarotnē bez testējamās vielas vai standartvielas.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto testējamās vielas iespējamās inhibitora iedarbības pārbaudei, apsējot šķīdumu, kurā minerālbarotnē ir salīdzināmas testējamās vielas un standartvielas koncentrācijas.

Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (skatīt I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiskā degradācija.

Ja testējamā viela varētu tikt ievērojamā daudzumā adsorbēta uz stikla, dūņām u. c., papildus veic orientējošu novērtējumu, lai noteiktu iespējamo adsorbcijas pakāpi un tādējādi testa piemērotību konkrētajai vielai (skatīt 1. tabulu). Vienā kolbā, kas satur testējamo vielu, pievieno sējmateriālu un sterilizējošu vielu.

Visās kolbās uzpilda kopējo tilpumu līdz 1 litram ar minerālbarotni, un pēc samaisīšanas no katras kolbas ņem paraugu IOO sākuma koncentrācijas noteikšanai (skatīt 2.4. papildinājumu). Kolbas noslēdz, piemēram, ar alumīnija foliju tā, lai notiktu kolbas satura gaisa apmaiņa ar apkārtējo atmosfēru. Tad kolbas ievieto kratītājā un sāk testēšanu.

▼B

III.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: testa suspensija

3. un 4. kolba: sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: noteikšanas kontrole

Vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: adsorbcijas kontrole

8. kolba: toksicitātes kontrole

Skatīt arī I.6.7. punktu.

III.2.6. **Testa gaita**

Visā testēšanas laikā divos atkārtojumos katrā kolbā nosaka IOO koncentrācijas pēc noteiktiem intervāliem pietiekami bieži, lai varētu noteikt 10 dienu intervāla sākumu un izdalīšanās procentu 10 dienu intervāla beigās. Katrai noteikšanai ņem minimāli nepieciešamo suspensijas daudzumu.

Pirms paraugu ņemšanas, ja vajadzīgs, kompensē iztvaikošanas zudumus, vajadzīgajā daudzumā pievienojot ūdeni atšķaidīšanai. Barotni pirms parauga ņemšanas rūpīgi samaisa un raugās, lai kolbu sienām pielipušais materiāls tiktu izšķīdināts vai suspendēts. Paraugu tūlīt filtrē caur membrānfiltru vai centrifugē (skatīt 2.4. papildinājumu). Ja filtrētos vai centrifugētos paraugus neanalizē tajā paša dienā, 2–4 ^{o}C temperatūrā tos var glabāt līdz 48 stundām, bet –18 ^{o}C un zemākā temperatūrā – arī ilgāku laiku.

III.3. DATI UN PĀRSKATS

III.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Saskaņā ar I.7.1. punktu (IOO noteikšana) aprēķina degradācijas procentu laikā t un fakultatīvi arī saskaņā ar I.7.2. punktu (īpašas analīzes).

Visus rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

III.3.2. Rezultātu derīgums

Skatīt I.5.2. punktu.

III.3.3. Pārskats

Skatīt I.8. punktu.

III.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

MODIFICĒTS ESAO SKRĪNINGA TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

▼B

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, t_0: mg/l vielas veidā

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/l

5. **OGLEKĻA NOTEIKŠANA**

Oglekļa analizators:

	Kolbas nr.		IOO pēc n dienām (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testējamā viela un sējmateriāls	1	a_1					
		a_2					
		a, vid. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, vid. $C_{b(t)}$					
Sējmateriāla tukšais paraugs bez testējamās vielas	3	c_1					
		c_2					
		c, vid. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, vid. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **IZEJAS DATU NOVĒRTĒŠANA**

Kolbas nr.		degradācijas % pēc n dienām				
		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

Kolbas nr.		degradācijas % pēc n dienām				
		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				
Vidējā vērtība (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Pēc D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

7. **ABIOTISKĀ KONTROLE** (fakultatīvi)

	Laiks (dienas)	
	0	t
IOO konc. (mg/l) sterilajā kontrolē	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{abiotiskā degradācija } (\%) = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFISKAS ĶĪMISKĀS ANALĪZES** (pēc izvēles)

	Testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	Primārā degradācija (%)
Sterilā kontrole	S_b	
Testa barotne ar sējmateriālu	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV DAĻA. CO_2 IZDALĪŠANĀS TESTS (C.4.-C metode)

IV.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu minerālās barotnes ar sējmateriālu, kas kā vienīgo oglekļa avotu satur zināmu testējamās vielas koncentrāciju (10–20 mg IOO vai *TOC*/l) 22 ± 2 °C temperatūrā aerē tumsā vai izkliedētā apgaismojumā. Degradācija notiek 28 dienas, nosakot izdalīto oglekļa dioksīdu, ko uztver bārija vai nātrija hidroksīdā un kuru nosaka, attitrējot hidroksīda pārākumu vai neorganiskā oglekļa veidā. No testējamās vielas izdalījušos oglekļa dioksīdu (kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga) izsaka procentos TCO_2. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildu IOO analīžu rezultātiem.

▼B

IV.2. TESTA METODES APRAKSTS

IV.2.1. **Aprīkojums**

a) Kolbas, 2–5 l tilpuma ar aerācijas cauruli, kas iet gandrīz līdz kolbas dibenam un izplūdi;

b) magnētiskie maisītāji gadījumos, kad testē mazšķīstošas vielas;

c) gāzu absorbcijas pudeles;

d) ierīce gaisa plūsmas regulēšanai un mērīšanai;

e) aparāts oglekļa dioksīda saistīšanai, ko izmanto tāda gaisa sagatavošanai, no kura izdalīts oglekļa dioksīds; var izmantot arī no CO_2 attīrīta skābekļa un slāpekļa maisījumu no gāzes baloniem pareizās attiecībās (20 % O_2:80 % N_2);

f) oglekļa dioksīda noteikšanas ierīce titrimetriski vai neorganiskā oglekļa analizatora veidā;

g) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

h) IOO analizators (fakultatīvi).

IV.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu skatīt I.6.2. punktu.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1 litram ar ūdeni atšķaidīšanai.

IV.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem; augsnēm vai iepriekšmināto maisījuma.

Skatīt I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

IV.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Piemēra veidā turpmāk norādīti tilpumi un svērumi 5 l tilpuma kolbām, kurās ir 3 l suspensijas. Ja izmanto mazākus tilpumus, skaitļus attiecīgi modificē, taču nodrošina, lai varētu precīzi izmērīt izdalījušos oglekļa dioksīda daudzumu.

Katrā 5 l tilpuma kolbā pārnes 2 400 ml minerālbarotnes. Pievieno attiecīgu daudzumu sagatavoto aktīvo dūņu (skatīt I.6.4.1. un I.6.5. punktu) tā, lai suspendēto daļiņu saturs galīgajos 3 l maisījuma ar sējmateriāla nepārsniegtu 30 mg/l. Sagatavotās dūņas var arī vispirms atšķaidīt, iegūstot 500–1 000 mg/l suspensijai minerālbarotnē, un tās alikvotu pievienot 5 l tilpuma kolbas saturam, lai iegūtu koncentrāciju 30 mg/l; tādējādi tiek nodrošināta lielāka precizitāte. Var izmantot citus sējmateriāla avotus (skatīt I.6.4.2. punktu).

Apsētos maisījumus līdz nākamajai dienai aerē ar gaisu, no kura attīrīts CO_2, lai no sistēmas aizvadītu oglekļa dioksīdu.

▼B

Pievieno testējamo vielu un atsevišķi standartvielu noteikta rezerves šķīduma tilpuma veidā, lai pievienotās vielas nodrošinātu 10 līdz 20 mg IOO vai TOC/l; dažās kolbās ķīmiskās vielas nepievieno sējmateriāla kontrolei. Mazšķīstošas testējamās vielas kolbās tieši pievieno pēc svara vai tilpuma vai rīkojas, kā aprakstīts 3. papildinājumā.

Ja vajadzīgs, vienu kolbu izmanto, lai pārbadītu testējamās vielas iespējamo inhibējošo iedarbību, gan testējamo vielu, gan standartvielu pievienojot tādās pašās koncentrācijās kā pārējās kolbās.

Ja vajadzīgs, vēl vienā sterilā kolbā, izmantojot ķīmisko vielu bez sējmateriāla (skatīt I.6.6. punktu) pārbauda, vai notiek ķīmiskās vielas abiotiska degradācija. Sterilizē, vajadzīgajā koncentrācijā pievienojot toksisku vielu.

Visās kolbās suspensijas atšķaida līdz 3 l, pievienojot minerālbarotni, kas pirms tam aerēta ar gaisu, kas attīrīts no CO_2. Ja vajadzīgs, var ņemt paraugus IOO analīzei (skatīt 2.4. papildinājumu) un/vai kādu īpašu analīzi. Gaisa izplūdē no kolbām pievieno absorbcijas pudeles.

Ja izmanto bārija hidroksīdu, visām 5 l kolbām virknē pievieno trīs absorbcijas pudeles, kurās katrā ir 100 ml 0,0125 M bārija hidroksīda šķīduma. Šķīdumā nedrīkst būt sulfātu un karbonātu nogulšņu, un tā koncentrācija jānosaka tieši pirms lietošanas. Izmantojot nātrija hidroksīdu, pievieno divus uztvērējus, no kuriem otrais tiek izmantots kontrolei, lai pārliecinātos, ka viss oglekļa dioksīds ir absorbēts pirmajā. Var izmantot ar seruma pudeļu aizbāžņiem aprīkotas absorbcijas pudeles. Katrā pudelē pārnes 200 ml 0,05 M nātrija hidroksīda šķīduma, kas ir pietiekami visa izdalītā oglekļa dioksīda daudzuma absorbēšanai, testējamajai vielai pilnīgi noārdoties. Arī tikko pagatavots nātrija hidroksīda šķīdums nelielā daudzumā satur karbonātus; to koriģē, atņemot karbonātu saturu tukšajā paraugā.

IV.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: testa suspensija

3. un 4. kolba: sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: noteikšanas kontrole

Vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: abiotiskā sterilā kontrole

7. kolba: toksicitātes kontrole

Skatīt arī I.6.7. punktu.

IV.2.6. **Testa gaita**

Testēšanu sāk, caur suspensiju ar ātrumu 30–100 ml/min barbotējot no CO_2 attīrītu gaisu. Periodiski CO_2 satura noteikšanai ņem absorbenta paraugus. Pirmo 10 dienu laikā ieteicams analīzes izdarīt katru otro vai trešo dienu, pēc tam līdz 28. dienai katru piekto dienu tā, lai varētu noteikt 10 dienu intervālu.

▼B

Ņem paraugus 28. dienā IOO un/vai specifiskām analīzēm, mēra suspensijas pH un katrā kolbā pievieno 1 ml koncentrētas hlorūdeņražskābes; kolbas līdz nākamajai dienai aerē, lai no testējamajām suspensijām aizvadītu oglekļa dioksīdu. Pēdējo izdalītā oglekļa dioksīda analīzi veic 29. dienā.

Dienās, kad nosaka CO_2, atvieno kolbai tuvāko absorberu ar bārija hidroksīdu, un hidroksīda šķīdumu titrē ar 0,05 M HCl, par indikatoru izmantojot fenolftaleīnu. Palikušos absorberus pārvieto par vienu vietu tuvāk kolbai un galā pievieno jaunu absorberu, kurā ir 100 ml svaiga 0,0125 M bārija hidroksīda. Pēc vajadzības veic titrēšanu, piemēram, gadījumos, kad pirmajā uztvērējā ievērojamā daudzumā veidojas nogulsnes un pirms tās rodas otrajā uztvērējā, vai vismaz reizi nedēļā. Ja par absorbentu izmanto NaOH, ar šļirci ņem nelielu paraugu (atkarībā no izmantotā oglekļa analizatora parametriem) nātrija hidroksīda no kolbai tuvākā absorbera. Paraugu injicē oglekļa analizatora 1.C daļā izdalījušās oglekļa dioksīda tiešai noteikšanai.

Otrā uztvērēja saturu analizē tikai testēšanas beigās, lai noteiktu oglekļa dioksīda pārneses korekciju.

IV.3. DATI UN PĀRSKATS

IV.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Absorberā uztvertā CO_2 daudzumu pēc titrēšanas aprēķina šādi:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kur:

V = 100 ml absorberā esošā tilpuma titrēšanai izmantotā HC1 daudzums (ml),

C_B = bārija hidroksīda šķīduma koncentrācija (M),

C_A = hlorūdeņražskābes šķīduma koncentrācija (M),

ja C_B ir 0,0125 M un C_A ir 0,05 M, 100 ml bārija hidroksīda titrēšanai patērē 50 ml, un CO_2 aprēķina šādi:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrēts} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Tādējādi šajā gadījumā titrēšanai izlietoto HCl tilpumu pārvērš mg izdalītā CO_2, to reizinot ar koeficientu 1,1.

Izmantojot attiecīgos titrēšanas rezultātus, aprēķina sējmateriāla un sējmateriāla kopā ar testējamo vielu izdalītā CO_2 daudzumus, kuru starpība ir ķīmiskās vielas izdalītā CO_2 daudzums.

Piemēram, ja sējmateriāla titrēšanai patērē 48 ml, bet sējmateriāla kopā ar testējamo vielu titrēšanai – 45 ml,

$$CO_2 \text{ daudzums no sējmateriāla} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 daudzums no sējmateriāla kopā ar testējamo vielu = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg

un tādējādi testējamās vielas izdalītā CO_2 masa ir 3,3 mg.

Biodegradāciju procentos aprēķina:

$$- \text{degradācija}\% = \frac{(\text{izdalījies } CO_2 \text{ daudzumsmg}) \times 100}{ThCO_2 \times \text{pievienotās testējamās vielas daudzumsmg}},$$

vai

$$- \text{degradācija}\% = \frac{(\text{izdalījies } CO_2 \text{ daudzumsmg}) \times 100}{(\text{TOC pievienotais daudzums} \times 3{,}67)}$$

kur 3,67 pārrēķina koeficients oglekļa izteikšanai oglekļa dioksīdā (44/12).

Degradācijas procentu konkrētā laika periodā nosaka, saskaitot katrai tā dienai aprēķinātās TCO_2 vērtības līdz termiņam, kuram to nosaka.

Nātrija hidroksīda absorberiem aprēķina izdalīto oglekļa dioksīda daudzumu, ko izsaka IC (mg), reizinot IC koncentrāciju absorbentā ar absorbenta tilpumu.

Degradācijas procentu aprēķina pēc formulas:

$$- TCO_2 = \frac{(\text{neorganiskā oglekļa daudzums, kas izdalījies no testa kolbas, mg} - \text{neorganiskā oglekļa daudzums, kas izdalījies no tukšā parauga, mg})}{(\text{MG TOC, kas pievienots testējamās vielas veidā})} \times 100$$

Pēc apraksta I.7. punktā aprēķina IOO izdalīšanos (nav obligāti). Šos un visus pārējos rezultātus reģistrē noteiktajās datu lapās.

IV.3.2. **Rezultātu derīgums**

Testējamās vielas suspensijas koncentrācija minerālbarotnē testēšanas sākumā nedrīkst būt zemāka par 5 % TC, un no sējmateriāla tukšā parauga kopējam izdalītajam CO_2 daudzumam testēšanas beigās parasti nevajadzētu pārsniegt 40 mg/l barotnes. Ja tiek noteiktas par 70 mg CO_2/l lielākas vērtības, kritiski jāizvērtē gan iegūtie dati, gan izraudzītā noteikšanas metode.

Skatīt arī I.5.2. punktu.

IV.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu.

IV.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

OGLEKĻA DIOKSĪDA IZDALĪŠANĀS TESTS

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

▼B

Sākuma koncentrācija barotnē: mg/l vielas veidā

Kolbā pievienotais kopīgais C daudzums: mg C

TCO_2: mg CO_2

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/l

5. **OGLEKĻA DIOKSĪDA PRODUCĒŠANA UN BIODEGRADĒJAMĪBA**

Metode: $Ba(OH)_2$/NaOH/cita

Laiks (dienas)	CO_2 veidošanās no testējamā parauga (mg)		CO_2 veidošanās no tukšā parauga (mg)		CO_2 veidošanās kumulatīvi (mg) (testējamā parauga un tukšā parauga starpība vidēji)		TCO_2 kumulatīvais $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	vidējā vērtība	3 / 4	vidējā vērtība	1	2	1	2	vidējā vērtība
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **OGLEKĻA ANALĪZE** (fakultatīvi)

Oglekļa analizators:

Laiks (dienas)	Tukšais paraugs (mg/l)	Testējamā viela (mg/l)
0	$C_{b(o)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) Vai inkubēšanas beigās.

▼B

$$\text{izdalītais IOO (\%)} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISKĀ DEGRADĀCIJA** (nav obligāti)

sterilajā kolbā pēc 28 dienām izveidojušos CO_2 daudzumu miligramos dala ar TCO_2:

$$\text{abiotiskā degradācija (\%)} = \frac{CO_2 \text{ formation in sterile in flask after 28 day (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V DAĻA. **MANOMETRISKĀ RESPIROMETRIJA** (C.4.-D metode)

V.1. METODES PRINCIPS

Noteiktu tilpumu apsētas minerālbarotnes, kura satur zināmu koncentrāciju testējamās vielas (100 mg/l testējamās vielas, kas rada vismaz 50–100 mg TSP/l) kā nomināli vienīgo organiskā oglekļa avotu, līdz 28 dienām maisa noslēgtā kolbā pastāvīgā temperatūrā (± 1 °C). Skābekļa patēriņu nosaka, mērot (elektrolītiski izdalītā) skābekļa daudzumu, kas vajadzīgs gāzes pastāvīga tilpuma uzturēšanai respirometra kolbā, vai pēc tilpuma vai spiediena (vai to abu) izmaiņām aparātā. Izdalījušos oglekļa dioksīdu absorbē kālija hidroksīda šķīdumā vai ar kādu citu šim nolūkam piemērotu absorbentu. Testējamās ķīmiskās vielas patērēto skābekļa daudzumu (ko koriģē pēc paralēli noteiktā tukšā parauga šķīduma patērētā daudzuma) izsaka kā TSP vai ĶSP daļu procentos. Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt arī pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildu specifisko analīžu rezultātiem, bet kopējo biodegradāciju – pēc IOO analīzes rezultātiem.

V.2. METODES APRAKSTS

V.2.1. **Iekārta**

a) Piemērots respirometrs;

b) temperatūras regulēšanas ierīce, kas uztur temperatūru vismaz ± 1 °C robežās vai precīzāk;

c) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

d) oglekļa analizators (fakultatīvi).

V.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu skatīt I.6.2. punktā.

Sajauc 10 ml šķīduma a) ar 800 ml ūdens atšķaidīšanai, pievieno pa 1 ml b) līdz d) šķīduma un uzpilda līdz 1 litram ar ūdeni atšķaidīšanai.

V.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana un iepriekšēja kondicionēšana**

Sējmateriālu var iegūt dažādi: no aktīvajām dūņām; attīrītiem notekūdeņiem; virszemes ūdeņiem un augsnēm vai iepriekšminēto maisījuma.

Skatīt I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. un I.6.5. punktu.

V.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Atsevišķās sērijās no rezerves šķīdumiem sagatavo testējamās vielas un standartvielas šķīdumus minerālbarotnē, parasti 100 mg vielas litrā (kas dod vismaz 50–100 mg TSP/l).

▼B

Ja nav sagaidāma nitrifikācija, kad attiecīgos aprēķinus izdara pēc nitrātu veidošanās, TSP vērtību aprēķina, veidojoties amonija sāļiem (skatīt 2.2. papildinājumu).

Pārbauda pH vērtības, kuras, ja vajadzīgs, noregulē līdz 7,4 ± 0,2.

Mazšķīstošas vielas pievieno vēlāk (skatīt turpmāk).

Ja jānosaka testējamās vielas toksicitāte, pagatavo vēl vienu šķīdumu minerālbarotnē, kas satur testējamo vielu un standartvielu tādās pašās koncentrācijās kā to atsevišķi pagatavotie šķīdumi.

Ja jāveic skābekļa fizikāli ķīmiskā patēriņa mērījumi, sagatavo testējamās vielas šķīdumu, parasti ar koncentrāciju 100 mg TSP/l, kas sterilizēts, pievienojot piemērotu toksisku vielu (skatīt I.6.6. punktu).

Kolbās vismaz divos atkārtojumos pārnes attiecīgos testējamās vielas un standartvielas šķīdumu daudzumus. Pārējās kolbās pārnes tikai minerālbarotni (sējmateriāla kontrolei) un, ja vajadzīgs, testējamās vielas un standartvielas jaukto šķīdumu, un sterilo šķīdumu.

Ja testējamā viela ir mazšķīstoša, šajā noteikšanas posmā to tieši pievieno pēc svara vai tilpuma vai rīkojas, kā aprakstīts 3. papildinājumā. CO_2 absorberā iepilda kālija hidroksīdu, nātronkaļķus vai citu absorbentu.

V.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

1. un 2. kolba: testa suspensija

3. un 4. kolba: sējmateriāla tukšais paraugs

5. kolba: noteikšanas kontrole

Vēlams, kā arī gadījumos, kad tas vajadzīgs:

6. kolba: sterilā kontrole

7. kolba: toksicitātes kontrole

Skatīt arī I.6.7. punktu.

V.2.6. **Testa gaita**

Kolbas iztur vajadzīgajā temperatūrā un tās, kuras vajadzīgs, apsēj ar aktīvajām dūņām vai citu sējmateriālu tā, lai suspendēto vielu koncentrācija nepārsniegtu 30 mg/l. Iekārtu samontē, iedarbina maisītāju, pārbauda aparāta hermētiskumu un sāk skābekļa patēriņa mērījumus. Parasti aparāts var darboties bez pastāvīgas uzraudzības un var veikt tikai nolasījumus un ikdienas pārbaudes, lai pārliecinātos, ka tiek uzturēts pareizs temperatūras un maisīšanas režīms.

Pēc regulāri un bieži veikto nolasījumu rezultātiem ar iekārtas ražotāja norādītajām metodēm aprēķina patērēto skābekļa daudzumu. Inkubēšanas beigās, kas parasti ir pēc 28 dienām, izmēra kolbu satura pH, īpaši tad, ja skābekļa patēriņš ir zems vai arī tas ir lielāks par $TSPNH_4$ (slāpekļa savienojumiem).

▼B

Ja vajadzīgs, sākumā un beigās no respirometra kolbām ņem paraugus IOO vai attiecīgās ķīmiskās vielas noteikšanai (skatīt 2.4. papildinājumu). Ņemot paraugu pirmoreiz, jārīkojas tā, lai būtu zināms kolbā palikušās suspensijas daudzums. Ja skābekli patērē testējamā viela, kuras sastāvā ir slāpeklis, nosaka nitrītu un nitrātu satura palielināšanos 28 dienu laikā un aprēķina nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzuma korekciju (5. papildinājums).

V.3. DATI UN PĀRSKATS

V.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Testējamās vielas skābekļa patēriņu (mg) pēc noteikta laika (kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga patēriņu tajā pašā laikā) dala ar izmantotās testējamās vielas daudzumu. Tādējādi aprēķina BSP (*BOD*), kas izteikts mg skābekļa/mg testējamās vielas, t. i.,

$$\text{BSP} = \frac{(\text{mg } O_2,\ \text{ko patērē testējamā viela} - \text{mg } O_2 \text{ ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs})}{(\text{mg testējamās vielas kolbā})}$$

= mg O_2 uz mg testējamās vielas

degradācijas procentu aprēķina pēc formulas:

$$\text{biodegradācija } (\%) = \%\ \text{TSP} = \frac{\text{BSP}(\text{mg } O_2/\text{mg vielas})}{\text{TSP}(\text{mg } O_2 \text{ vielas})} \times 100$$

vai

$$\%\ \text{KSP} = \frac{\text{BSP}(\text{mg } O_2/\text{mg vielas})}{\text{KSP}(\text{mg } O_2 \text{ vielas})} \times 100$$

Jāpiezīmē, ka pēc šīm abām metodēm iegūto rezultātu skaitliskās vērtības ne vienmēr ir vienādas; ieteicams izmantot šo otru metodi.

Testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, atkarībā no tā, kas ir sagaidāms vai zināms attiecībā uz nitrifikāciju, izmanto attiecīgo TSP (NH_4 vai NO_3) vērtību (2.2. papildinājums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (5. papildinājums).

Ja fakultatīvi nosaka arī organiskā oglekļa un/vai attiecīgās vielas saturu, degradācijas procentu aprēķina saskaņā ar I.7. punktu.

Visus rezultātus reģistrē pievienotajās datu lapās.

V.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sējmateriāla tukšā parauga skābekļa patēriņš parasti ir 20–30 mg O_2/l, un 28 dienās tas nedrīkst pārsniegt 60 mg/l. Ja tā vērtības pārsniedz 60 mg/l, kritiski jāizvērtē eksperimentālie dati un to iegūšanas metodes. Ja pH vērtība nav robežās no 6 līdz 8,5 un testējamās vielas skābekļa patēriņš nepārsniedz 60 %, noteikšana jāatkārto ar testējamo vielu zemākā koncentrācijā.

Skatīt arī I.5.2. punktu.

▼B

V.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu.

V.4. **DATU LAPA**

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

MANOMETRISKĀS RESPIROMETRIJAS METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l

Sākuma koncentrācija barotnē, C_0: mg/l

Testa kolbas tilpums (V): ml

TSP vai ĶSP: mg O_2/mg testējamās vielas (NH_4 vai NO_3)

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Suspendēto vielu koncentrācija reakcijas maisījumā: mg/1

5. **SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ: BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJA**

		Laiks (dienas)											
		0		7		14			21			28	
Testējamās vielas O_2 patēriņš (mg)	1												
	2												
	a, vidēji												
Tukšā parauga O_2 patēriņš (mg)	3												
	4												
	b, vidēji												
Koriģētais BSP (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSP uz mg testējamās vielas	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Laiks (dienas)											
		0		7		14			21			28	
degradācija %	D_1 (a_1)												
$\frac{BSP}{TSP} \times 100$	D_2 (a_2)												
	Vidējā vērtība (*)												

V = barotnes tilpums testa kolbā.
(*) Pēc D_1 un D_2 nevar aprēķināt vidējo vērtību, ja tie ir ievērojami atšķirīgi.

N. B. Līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **NITRIFIKĀCIJAS KOREKCIJA** (skatīt 5. papildinājumu)

Diena		0	28	Starpība
i)	nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)			N
ii)	skābekļa ekvivalents (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	nitrītjonu koncentrācija (mg N/l)			N
iv)	skābekļa ekvivalents (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii)+ iv)	kopīgais skābekļa ekvivalents	—	—	

7. **OGLEKĻA ANALĪZE** (nav obligāti)

Oglekļa analizators:

Laiks (dienas)	Tukšais paraugs (mg/l)	Testējamā viela (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_0)
28 (*)	(C_{bit})	(C_t)

(*) Vai inkubēšanas beigās.

$$\text{izdalītais IOO } (\%) = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **KONKRĒTĀ VIELA** (fakultatīvi)

S_b = koncentrācija fizikāli ķīmiskajā (sterilajā) kontrolē pēc 28 dienām

S_a = koncentrācija kolbā ar sējmateriālu pēc 28 dienām,

$$\text{biodegradācija } (\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISKĀ DEGRADĀCIJA** (fakultatīvi)

a = skābekļa patēriņš sterilajās kolbās pēc 28 dienām, (mg)

$$\text{skābekļa patēriņš uz mg testējamās vielas} = \frac{a}{C_o V} \times 100$$

▼B

(skatīt 1. un 3. iedaļu)

$$\text{abiotiskā degradācija (\%)} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI DAĻA. **SLĒGTO PUDEĻU METODE** (C.4.-E metode)

VI.1. METODES PRINCIPS

Testējamās vielas šķīdumu minerālbarotnē, parasti 2–5 mg/l, apsēj ar relatīvi nelielu jauktas populācijas sējmateriāla daudzumu un pilnīgi piepildītas noslēgtās pudeles iztur tumšā vietā pastāvīgā temperatūrā. Pēc degradācijas 28 dienu periodā veic izšķīdušā skābekļa analīzes. Testējamās ķīmiskās vielas patērēto skābekļa daudzumu, ko koriģē pēc paralēli noteiktā tukšā parauga šķīduma patērētā daudzuma, izsaka kā TSP vai ĶSP daļu procentos.

VI.2. METODES APRAKSTS

VI.2.1. **Iekārta**

a) BSP noteikšanas pudeles ar stikla aizbāžņiem, piemēram, 250–300 ml;

b) ūdens vanna vai termostats, kurā pudeles iztur tumsā nemainīgā temperatūrā (± 1 °C vai precīzāk);

c) liela tilpuma (2–5 l) stikla pudeles barotņu gatavošanai un BSP pudeļu pildīšanai;

d) skābekļa elektrods un oksimetrs vai iekārtas un reaģenti titrēšanai pēc Vinklera.

VI.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

Rezerves šķīdumu sagatavošanu skatīt I.6.2. punktā.

Sajauc pa 1 (vienam) mililitram a) līdz d) šķīduma un ar destilētu ūdeni atšķaida līdz 1 litram.

VI.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana**

Sējmateriālu parasti iegūst no attīrītiem notekūdeņiem, kurus aizvada no attīrīšanas iekārtām vai laboratorijas iekārtām, kurās galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Vēl cits sējmateriāla avots ir virszemes ūdeņi. Parasti uz litru barotnes ņem no viena piliena (0,05 ml) līdz 5 ml filtrāta; var būt jāveic izmēģinājumi optimālā konkrēto attīrīto notekūdeņu tilpuma noteikšanai (skatīt I.6.4.2. un I.6.5. punktu).

VI.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Minerālbarotni intensīvi aerē vismaz 20 min. Visai paraugu sērijai izmanto minerālbarotni no vienas ražošanas partijas. Parasti barotne ir lietošanai gatava pēc 20 h stāvēšanas noteikšanas temperatūrā. Kontroles nolūkā nosaka izšķīdušā skābekļa saturu; 20 °C temperatūrā tam jābūt apmēram 9 mg/l. Visas ar gaisu piesātinātās barotnes pārnešanas un uzpildīšanas operācijas veic tā, lai neveidotos burbuļi, piemēram, izmantojot sifonus.

▼B

Vienlaicīgai noteikšanai sagatavo paralēlas BSP pudeļu sērijas ar testējamo vielu un standartvielu. BSP pudelēm, ieskaitot sējmateriāla tukšo paraugu pudeles, jābūt pietiekamā daudzumā, lai ar vajadzīgajiem intervāliem, piemēram, pēc 0, 7, 14, 21 un 28 dienām, skābekļa patēriņu varētu mērīt vismaz divos atkārtojumos. Lai būtu iespējams noteikt 10 dienu intervālu, var būt vajadzīgs vēl lielāks skaits pudeļu.

Lielajās pudelēs apmēram līdz vienai trešdaļai to tilpuma pārnes ar gaisu pilnīgi piesātinātu minerālbarotni. Tad atsevišķās lielajās pudelēs vajadzīgajā daudzumā pievieno testējamās vielas un standartvielas rezerves šķīdumus, parasti tik daudz, lai vielu galīgā koncentrācija nepārsniegtu 10 mg/l. Lielajā pudelē, kurā ir barotne tukšā parauga kontrolei, nekādas ķīmiskās vielas nepievieno.

Lai nodrošinātu, ka netiek ierobežota sējmateriāla aktivitāte, izšķīdušā skābekļa koncentrācija BSP pudelēs drīkst pazemināties ne vairāk kā līdz 0,5 mg/l. Tāpēc testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt apmēram 2 mg/l. Tomēr grūti noārdāmas vielas un vielas ar zemu TSP vērtību var izmantot koncentrācijas no 5 līdz 10 mg/l. Dažkārt var būt ieteicams izveidot testējamās vielas paralēlas izmēģinājumu sērijas ar divām dažādām koncentrācijām, piemēram, 2 un 5 mg/l. Parasti aprēķina TSP vērtību, kāda ir, veidojoties amonija sāļiem, bet, ja var notikt nitrifikācija vai ir zināms, ka tā notiek, TSP aprēķina, ņemot vērā nitrātu veidošanos (TSP_{NO3}: skatīt 2.2. papildinājumu). Taču, ja nitrifikācija nenotiek līdz galam vai nenotiek pavisam, veic korekciju pēc analītiski noteiktajām nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām (skatīt 5. papildinājumu).

Ja jāpēta testējamās vielas toksiskā iedarbība (piemēram, gadījumos, kad sākotnēji tiek konstatēts, ka tās bioloģiskās noārdīšanās spēja ir zema), ir vajadzīgas citas pudeļu sērijas.

Citā lielajā kolbā sagatavo ar gaisu piesātinātu minerālbarotni (apmēram trešdaļu tās tilpuma), pievieno testējamo vielu un standartvielu galīgajās koncentrācijas, kas parasti ir tādas pašas kā pārējās lielajās pudelēs.

Šķīdumus lielajās pudelēs apsēj ar attīrītu notekūdeni (no viena piliena vai apmēram 0,05 ml līdz apmēram 5 ml uz litru) vai ar sējmateriālu no cita avota, piemēram, upes ūdeni (skatīt I.6.4.2. punktu). Tad šķīdumus atšķaida ar aerētu minerālbarotni un sajauc, izmantojot šļūteni, kas sniedzas līdz pudeles dibenam.

VI.2.5. **Kolbu skaits parastā sērijā**

Parastā sērijā izmanto šādas kolbas:

— vismaz 10 kolbas, kurās ir testējamā viela un sējmateriāls (testa suspensija),

— vismaz 10 pudeles, kurās ir tikai sējmateriāls (sējmateriāla tukšais paraugs),

— vismaz 10 kolbas, kurās ir standartviela un sējmateriāls (metodes kontrole),

▼B

— un vajadzības gadījumos sešas pudeles, kurās ir testējamā viela, standartviela un sējmateriāls (toksicitātes kontrole). Lai būtu iespējams noteikt 10 dienu intervālu, var būt vajadzīgs apmēram divreiz lielāks skaits pudeļu.

VI.2.6. Testa gaita

Sagatavotos šķīdumus nekavējoties iepilda attiecīgajās BSP pudeļu grupās caur šļūteni no lielās pudeles apakšējās ceturtdaļas (nevis no apakšas) tā, lai visas BSP pudeles tiktu pilnīgi piepildītas. Uzmanīgi noslēdz, izspiežot gaisa burbuļus. Sākuma – nulles laika – paraugos tūlīt nosaka izšķīdušo skābekli pēc Vinklera vai elektrodu metodes. Pudeļu saturu var iekonservēt, lai analīzes veiktu vēlāk pēc Vinklera metodes, pievienojot mangāna(II) sulfātu un nātrija hidroksīdu (Vinklera pirmo reaģentu). Pirms veikt nākamos analīzes posmus pēc Vinklera metodes, glabā cieši noslēgtās pudelēs, kas satur brūna mangāna(III) hidroksīda veidā fiksētu skābekli, tumšā vietā 10–20 °C temperatūrā ne ilgāk kā 24 stundas. Pārējās atkārtojumu pudeles noslēdz tā, lai tajās nebūtu gaisa burbuļu, un inkubē 20 °C temperatūrā tumsā. Visām sērijām jābūt paralēlām sērijām sējmateriāla tukšā parauga noteikšanai. Izšķīdušā skābekļa analīzēm ar noteiktiem intervāliem (ne retāk kā reizi nedēļā) 28 dienu inkubēšanas perioda laikā ņem pudeles vismaz divos atkārtojumos.

Iknedēļas paraugi dod iespējas noteikt izdalīšanās procentu 14 dienu intervālā, bet paraugu ņemšana ik pēc 3–4 dienām nodrošina iespējas noteikt 10 dienu intervālu, kam var būt vajadzīgs apmēram divreiz vairāk pudeļu.

Testējamajām vielām, kas satur slāpekli, jāveic nitrifikācijai patērētā skābekļa korekcija. Šim nolūkam izšķīdušā skābekļa koncentrāciju nosaka pēc skābekļa elektroda metodes un pēc tam no BSP pudeles ņem paraugu nitrītjonu un nitrātjonu satura noteikšanai. Pēc nitrītu un nitrātu koncentrācijas izmaiņām aprēķina nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzumu (skatīt 5. papildinājumu).

VI.3. DATI UN PĀRSKATS

VI.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Vispirms aprēķina BSP katra perioda beigās, atņemot skābekļa patēriņu (mg O_2/l) sējmateriāla tukšajā paraugā no testējamās vielas skābekļa patēriņa. Īpatnējo BSP miligramos skābekļa uz miligramu testējamās vielas aprēķina, šo koriģēto samazinājumu dalot ar testējamās vielas koncentrāciju (mg/l). Aprēķina biodegradācijas procentu, īpatnējo BSP ar īpatnējo TSP (kuru aprēķina saskaņā ar 2.2. papildinājumu) vai ar ĶSP (ko nosaka analītiski, skatīt 2.3. papildinājumu) šādi:

$$\text{BSP} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ ko patērē testējamā viela} - \text{mg } O_2 \text{ ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs})}{(\text{mg testējamās vielas kolbā})}$$

▼B

= mg O_2 uz mg testējamās vielas

$$\text{–biodegradācija (\%)} = \frac{\text{BSP (mg } O_2\text{/mg testējamās vielas)}}{\text{TSP(mg } O_2\text{/mg testējamās vielas)}} \times 100$$

vai

$$\text{–degradācija (\%)} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg testējamās vielas)}}{\text{COD(mg } O_2\text{/mg testējamās vielas)}} \times 100$$

Jāpiezīmē, ka pēc šīm abām metodēm iegūto rezultātu skaitliskās vērtības ne vienmēr ir vienādas; ieteicams izmantot šo otru metodi.

Testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, atkarībā no tā, kas ir sagaidāms vai zināms par nitrifikāciju, izmanto attiecīgo TSP (NH_4 vai NO_3) vērtību (2.2. papildinājums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (5. papildinājums).

VI.3.2. **Rezultātu derīgums**

Skābekļa satura samazinājums pēc 28 dienām sējmateriāla tukšajā paraugā nedrīkst pārsniegt 1,5 mg izšķīdušā skābekļa/l. Ja iegūst par minēto augstākas vērtības, jāpārbauda eksperimenta metodes. Atlikusī skābekļa koncentrācija testa pudelēs nedrīkst būt mazāka par 0,5 mg/l. Tik zemas skābekļa koncentrācijas uzskatāmas par ticamām tikai tad, ja ar izmantoto izšķīdušā skābekļa satura noteikšanas metodi tās iespējams izmērīt precīzi.

Skatīt arī I.5.2. punktu.

VI.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu.

VI.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

SLĒGTO PUDEĻU METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l

Sākuma koncentrācija pudelē: mg/l

TSP vai ĶSP: mg O_2/mg testējamās vielas

4. **SĒJMATERIĀLS**

Avots:

Attīrīšana:

▼B

Iepriekšēja kondicionēšana, ja veikta:

Reakcijas maisījuma koncentrācija: mg/l

5. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA NOTEIKŠANA**

Metode: Vinklera/elektroda

Kolbu analīzes

Inkubēšanas laiks (dienas)			Izšķīdušais skābeklis (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Tukšais paraugs (bez vielas)	1	C_1				
	2	C_2				
Vidējais	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testējamā viela	1	a_1				
	2	a_2				
Vidējais	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Piezīme: līdzīgus formātus var izmantot arī standartvielai un toksicitātes kontrolei.

6. **NITRIFIKĀCIJAS KOREKCIJA** (skatīt 5. papildinājumu)

Inkubēšanas laiks (dienas)		0	n_1	n_2	n_3
i)	nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)				
ii)	nitrātjonu koncentrācija (mg N/l)	—			
iii)	skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			
iv)	nitrītjonu koncentrācija (mg N/l)				
v)	nitrītjonu koncentrācijas izmaiņas (mg N/l)	—			
vi)	skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			
iii)+ vi)	kopējais skābekļa ekvivalents (mg/l)	—			

7. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA SAMAZINĀŠANĀS: DEGRADĀCIJA %**

	Samazinājums pēc n dienām (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
1. KOLBA: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. KOLBA: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Samazinājums pēc n dienām (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
1. KOLBA: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test. vielas konc.} \times \text{ThOD vielas}}$				
2. KOLBA: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{test. vielas konc.} \times \text{ThOD vielas}}$				
$\%\ D\ \text{vid.}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Vidējo vērtību neaprēķina, ja atkārtojumos iegūtie rezultāti ir ievērojami atšķirīgi.

m_{to} = vērtība testa kolbā laikā 0

m_{tx} = vērtība testa kolbā laikā x

m_{bo} = tukšā parauga vērtība laikā 0

m_{bx} = tukšā parauga vērtība laikā x

Aprēķina arī nitrifikācijas korekciju iii + vi no 6. iedaļas.

8. **TUKŠĀ PARAUGA IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA SAMAZINĀŠANĀS**

Tukšā parauga skābekļa patēriņš: (m_{bo} – m_{b28}) mg/l. Pēc šā patēriņa nosaka testēšanas rezultātu derīgumu. Tam jābūt mazākam par 1,5 mg/l.

VII DAĻA. ***MITI*** **METODE** (C.4.-F metode)

VII.1. METODES PRINCIPS

Automātiski 28 dienas aptumšotā noslēgtā respirometrā 25 ± 1 °C temperatūrā maisot mēra skābekļa patēriņu testējamās vielas šķīdumā vai suspensijā minerālbarotnē, kas apsēta ar īpaši izaudzētiem neadaptētiem mikroorganismiem. Izdalījušos oglekļa dioksīdu absorbē ar nātronkaļķiem. Biodegradāciju izsaka skābekļa patēriņa procentos (ar tukšā parauga korekciju) no teorētiskā skābekļa patēriņa (TSP). Primārās biodegradācijas pakāpi var aprēķināt arī pēc inkubācijas sākumā un beigās veikto papildu specifisko analīžu rezultātiem vai pēc IOO analīzes rezultātiem.

VII.2. TESTA METODES APRAKSTS

VII.2.1. **Aprīkojums**

a) Automātiskā elektrolītiskā BSP mērīšanas ierīce vai respirometrs, kas parasti aprīkots ar sešām pudelēm, kuru tilpums ir 300 ml, ar vāciņu CO_2 absorbentam;

▼B

b) termostatējama kamera un/vai ūdens vanna ar 25 ± 1 °C vai precīzāk;

c) membrānfiltrēšanas ierīce (fakultatīvi);

d) oglekļa analizators (nav obligāti).

VII.2.2. **Minerālbarotņu sagatavošana**

No analītiski tīriem reaģentiem pagatavo šādus rezerves šķīdumus (I.6.1. punkts):

a)	monokālija dihidrogenortofosfāts, KH_2PO_4	8,50 g
	dikālija monohidrogenortofosfāts, K_2HPO_4	21,75 g
	dinātrija monohidrogenortofosfāta dodekahidrāts Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	amonija hlorīds, NH_4Cl	1,70 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.	
	Šķīduma pH jābūt 7,2.	
b)	magnija sulfāta heptahidrāts, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
c)	kalcija hlorīds, bezūdens, $CaCl_2$	27,50 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram	
d)	dzelzs(III) hlorīda heksahidrāts, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Izšķīdina ūdenī un atšķaida līdz 1 litram.	

Ņem pa 3 ml no šķīdumiem a), b), c) un d) un atšķaida līdz 1 litram.

VII.2.3. **Sējmateriāla sagatavošana**

Ņem svaigus paraugus no vismaz desmit vietām, galvenokārt teritorijās, kur lietotas un izplūdušas dažādas ķīmiskās vielas. No tādām vietām kā notekūdeņu attīrīšanas iekārtas, ražošanas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas, upes, ezeri, jūras, ņem 1 l dūņu, augsnes virskārtas, ūdens u. c. un rūpīgi sajauc. Pēc peldošo daļiņu atdalīšanas un nostādināšanas ar nātrija hidroksīdu vai fosforskābi noregulē dzidrā šķīduma pH līdz 7 ± 1.

Ar dzidro šķīdumu pilnīgi piepilda aktīvo dūņu trauku un šķidrumu aerē apmēram 23 l/2/h. 30 minūtes pēc aerācijas pārtraukšanas izlej apmēram trešdaļu no visa dzidrā šķīduma daudzuma un nostādinātajam materiālam pievieno tikpat daudz šķīduma (pH 7), kas satur pa 0,1 % glikozes, peptona un monokālija ortofosfāta, un atsāk aerāciju. Šo procedūru atkārto vienreiz dienā. Aktīvo dūņu iekārtas jāekspluatē saskaņā ar labu praksi: attīrītajiem notekūdeņiem jābūt dzidriem, to temperatūrai 25 ± 2 °C, vides reakcijai pH 7 ± 1, dūņām viegli jānogulsnējas, ar pietiekamu aerāciju maisījumam pastāvīgi jānodrošina aerobi apstākļi, tajās jābūt vienšūņiem, un dūņu aktivitāte vismaz reizi trijos mēnešos jāpārbauda ar standartvielu. Par sējmateriālu neizmanto dūņas, ja iekārta darbojas mazāk nekā mēnesi vai ilgāk par četriem mēnešiem. Pēc tam ar regulāriem intervāliem reizi trijos mēnešos ņem paraugus no vismaz desmit vietām.

▼B

Lai uzturētu svaigo un veco dūņu aktivitāti vienā līmenī, sajauc vienādus tilpumus filtrētā dzidrā šķīduma no lietošanā esošajām aktīvajām dūņām un filtrētā dzidrā šķīduma no desmit vietām paņemtā maisījuma un maisījumu kultivē, kā noteikts iepriekš. Dūņas lietošanai par sējmateriālu ņem 18–24 h pēc iekārtas palaišanas.

VII.2.4. **Kolbu sagatavošana**

Sagatavo šādas sešas kolbas:

Nr. 1: testējamā viela ūdens šķīdumā koncentrācijā 100 mg/l,

Nr. 2, 3 un 4: testējamā viela minerālbarotnē koncentrācijā 100 mg/l,

Nr. 5: standartviela (piemēram, anilīns) minerālbarotnē koncentrācijā 100 mg/l,

Nr. 6: tikai minerālbarotne.

Mazšķīstošas testējamās vielas pievieno tieši pēc masas vai tilpuma vai ar tām rīkojas, kā aprakstīts 3. papildinājumā, tomēr nedrīkst lietot ne šķīdinātājus, ne emulgatorus. Visām kolbām speciālajos aizbāžņos ievieto CO_2 absorbentu. Kolbās Nr. 2, 3 un 4 noregulē pH līdz 7,0.

VII.2.5. **Testa gaita**

Apsēj kolbas Nr. 2, 3, un 4 (testējamās suspensijas), Nr. 5 (aktivitātes kontrole) un Nr. 6 (sējmateriāla tukšais paraugs) ar nelielu daudzumu sējmateriāla, lai iegūtu koncentrāciju 30 mg/l suspendēto vielu. Sējmateriālu nepievieno kolbā Nr. 1, ko izmanto par abiotisko kontroli. Iekārtu samontē, pārbauda aparāta hermētiskumu, iedarbina maisītāju un sāk skābekļa patēriņa mērījumus tumsas apstākļos. Katru dienu pārbauda temperatūru, maisītāja un skābekļa patēriņa kulonometriskās reģistrēšanas ierīces darbību un novēro kolbu satura krāsas izmaiņas. Nolasa skābekļa patēriņu sešās kolbās, izmantojot piemērotu tiešo mērījumu metodi, piemēram, no sešpunktu pašrakstītāja diagrammas, kas zīmē BSP patēriņa līkni. Inkubēšanas beigās, parasti pēc 28 dienām, mēra kolbu satura pH un nosaka testējamās vielas atlikuma un no tiem veidojušos starpproduktu koncentrāciju, IOO koncentrāciju (2.4. papildinājums). Īpaši uzmanīgi strādā ar gaistošām vielām. Ja sagaidāms, ka notiks nitrifikācijas process, ja iespējams, nosaka nitrātjonu un nitrītjonu koncentrāciju.

VII.3. DATI UN PĀRSKATS

VII.3.1. **Rezultātu apstrāde**

Testējamās vielas skābekļa patēriņu (mg) pēc noteikta laika, kas koriģēts pēc sējmateriāla tukšā parauga patēriņa tajā pašā laikā, dala ar izmantotās testējamās vielas daudzumu. Tādējādi aprēķina BSP, kas izteikts mg skābekļa/mg testējamās vielas, t. i.:

$$BSP = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ ko patērē testējamā viela} - \text{mg } O_2 \text{ , ko patērē sējmateriāla tukšais paraugs})}{(\text{mg testējamās vielas kolbā})}$$

= mg O_2 uz mg testējamās vielas

▼B

Biodegradāciju procentos aprēķina šādi:

$$-\text{Biodegradācija (\%)} = \text{\% TSP} = \frac{\text{BSP (mg } O_2/\text{mg vielas)}}{\text{TSP (mg } O_2/\text{mg vielas)}} \times 100$$

Maisījumiem TSP aprēķina pēc elementanalīzes rezultātiem tāpat kā individuālām vielām. Izmanto attiecīgo TSP (TSP_{NH4} vai TSP_{NO3}) atkarībā no tā, vai nitrifikācija nenotiek vai norit līdz galam (2.2. papildinājums). Ja nitrifikācija notiek, taču ne pilnīgi, pēc nitrītjonu un nitrātjonu koncentrāciju izmaiņām aprēķina korekciju skābeklim, kas patērēts nitrifikācijai (5. papildinājums).

Primāro degradāciju procentos aprēķina pēc konkrētās (sākotnējās) vielas zudumiem (skatīt I.7.2. punktu).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ja testējamās vielas zudumi konstatēti kolbā Nr. 1, kurā mēra fizikāli ķīmisko izdalīšanos, to reģistrē un testējamās vielas koncentrāciju (S_b) šajā kolbā pēc 28 dienām izmanto biodegradācijas procentu aprēķināšanai.

Ja veic IOO noteikšanu (fakultatīvi), aprēķina kopējo biodegradāciju no:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

kā aprakstīts I.7.1. punktā. Ja kolbā Nr. 1 ir samazinājies IOO, mērot fizikāli ķīmisko izdalīšanos, biodegradācijas procenta aprēķināšanai izmanto IOO koncentrāciju šajā kolbā.

Visus rezultātus reģistrē pievienotajās datu lapās.

VII.3.2. **Rezultātu derīgums**

Sējmateriāla tukšā parauga skābekļa patēriņš parasti ir 20–30 mg O_2/l, un 28 dienās tas nedrīkst pārsniegt 60 mg/l. Ja tā vērtības pārsniedz 60 mg/l, kritiski jāizvērtē eksperimentālie dati un to iegūšanas metodes. Ja pH vērtība nav robežās no 6 līdz 8,5 un testējamās vielas skābekļa patēriņš nepārsniedz 60 %, noteikšana jāatkārto ar testējamo vielu zemākā koncentrācijā.

Skatīt arī I.5.2. punktu.

Ja anilīna degradācijas procents, kas aprēķināts pēc skābekļa patēriņa, pēc septiņām dienām nepārsniedz 40 %, bet pēc 14 dienām 65 %, iegūtie rezultāti uzskatāmi par nederīgiem.

VII.3.3. **Pārskats**

Skatīt I.8. punktu.

VII.4. DATU LAPA

Turpmāk dots datu lapas paraugs.

MITI (I) METODE

1. **LABORATORIJA**

2. **TESTĒŠANAS SĀKUMA DATUMS**

▼B

3. **TESTĒJAMĀ VIELA**

Nosaukums:

Rezerves šķīduma koncentrācija: mg/l vielas veidā

Sākuma koncentrācija barotnē, C_0: mg/l vielas veidā

Reakcijas maisījums, V: ml

TSP: mg O_2/l

4. **SĒJMATERIĀLS**

Dūņu paraugu ņemšanas vietas:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Suspendēto vielu koncentrācija aktīvajās dūņās pēc aklimatizācijas sintētiskajā notekūdenī = … mg/l

Aktīvo dūņu tilpums uz litru gatavas barotnes = … ml

Dūņu koncentrācija gatavajā barotnē = …mg/l

5. **SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ: BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJA**

Izmantotā respirometra veids:

			Laiks (dienas)				
			0	7	14	21	28
Testējamās vielas O_2 patēriņš (mg)	a_1						
	a_2						
	a_3						
Tukšā parauga O_2 patēriņš (mg)	b						
Koriģētais O_2 patēriņš (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BSP uz mg testējamās vielas	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. kolba					
		2. kolba					
		3. kolba					
degradācija % $\frac{BSP}{TSP} \times 100$		1					
		2					
		3					
		vidējā vērtība (*)					

(*) Vidējo vērtību neaprēķina, ja atkārtojumos iegūtie rezultāti ir ievērojami atšķirīgi.

▼B

N. B.! Līdzīgas formas tabulu var izmantot standartvielai.

6. **OGLEKĻA ANALĪZE** (fakultatīvi)

Oglekļa analizators:

Flakons/kolba	IOO				Izdalītais IOO %	Vidējais
	mērītā vērtība		koriģētā vērtība			
Ūdens + testējamā viela	a				—	—
Dūņas + testējamā viela	b_1		$b_1 - c$			
Dūņas + testējamā viela	b_2		$b_2 - c$			
Dūņas + testējamā viela	b_3		$b_3 - c$			
Tukšā parauga kontrole	c		—		—	—

Izdalītais IOO % : $\frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$

7. **ĪPAŠU ĶĪMISKO ANALĪŽU DATI**

	Testējamās vielas atlikušais daudzums testēšanas beigās (mg/l)	degradācija %
Tukšais paraugs ar ūdeni	Sb	
Barotne ar sējmateriālu	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

degradācija % $= \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Attiecīgi kolbām a1, a2 un a3 aprēķina degradācijas %.

8. **PIEZĪMES**

Ja iespējams, jāpievieno BSP izmaiņu līkne laikā.

▼B

I PAPILDINĀJUMS

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

DO: izšķīdušais skābeklis ir ūdens paraugā izšķīdušā skābekļa koncentrācija (mg/l).

BSP (*BOD*): bioķīmiskais skābekļa patēriņš ir skābekļa daudzums (g), ko mikroorganismi patērē testējamā savienojuma metabolizēšanai; izsaka arī kā skābekļa uzņemšanu uz 1 g testējamā savienojuma. (Skatīt C.5. metodi.)

ĶSP (*COD*): ķīmiskais skābekļa patēriņš ir testējamā savienojuma oksidēšanai ar kālija dihromātu vidē patērētais skābekļa daudzums (g); tas ir oksidējamas vielas daudzuma mērs; izsaka arī kā skābekļa patēriņu uz 1g testējamā savienojuma. (Skatīt C.6. metodi.)

IOO (*DOC*): izšķīdušais organiskais ogleklis ir organisko savienojumu veidā saistītā oglekļa saturs ūdens šķīdumā vai iziet cauru 0,45 mikrometru filtram vai paliek centrifugātā pēc centrifugēšanas 15 min 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g).

TSP (*ThOD*): teorētiskais skābekļa patēriņš ir kopējais skābekļa patēriņš (mg), kas vajadzīgs ķīmiskās vielas pilnīgai oksidēšanai; to aprēķina pēc ķīmiskās formulas (skatīt 2.2. papildinājumu) un to arī izsaka mg skābekļa, ko patērē uz miligramu testējamā savienojuma.

TCO_2: teorētiskais oglekļa dioksīds ir aprēķinātais oglekļa dioksīda daudzums (mg), kuram jāveidojas no zināma vai izmērīta oglekļa daudzuma, kas ir testējamā savienojuma sastāvā, to pilnīgi mineralizējot; izsaka arī miligramos oglekļa dioksīda, kas izdalās uz miligramu testējamā savienojuma.

TOC: kopējais organiskais ogleklis ir summārais oglekļa saturs paraugā, kas ir šķīdumā un suspensijā esošā organiskā oglekļa summa.

IC: neorganiskais ogleklis.

TC: kopējais ogleklis ir organisko un neorganisko savienojumu veidā saistītais ogleklis, kuru satur paraugs.

Primārā biodegradācija:

ir vielas ķīmiskās struktūras izmaiņas, bioloģiskas iedarbības rezultātā tai zaudējot specifiskās īpašības.

Pilnīga biodegradācija (aerobos apstākļos):

ir degradācijas līmenis, kādā testējamo savienojumu pilnībā izmanto mikroorganismi, izdalot oglekļa dioksīdu, ūdeni, minerālsāļus un jaunas mikroorganismu šūnu sastāvdaļas (biomasu).

Viegli bioloģiski noārdāmi:

noteiktas drošības pārbaudes uz pilnīgu biodegradāciju izgājušu ķīmisko vielu pieņemta klasifikācija; šīs pārbaudes ir tik stingras, ka var pieņemt, ka aerobos apstākļos ūdens vidē šie savienojumi noārdīsies ātri un pilnīgi.

▼B

Būtībā bioloģiski noārdāmi:

tādu ķīmisko vielu klasifikācija, par kurām ar atzītām bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšanas metodēm ir iegūtas neapšaubāmas liecības par to (primāru vai pilnīgu) biodegradāciju.

Attīrāmība:

iespējas savienojumus atdalīt notekūdeņu bioloģiskās attīrīšanas procesā, nelabvēlīgi neietekmējot attīrīšanas procesu darbību. Parasti attīrāmi ir viegli bioloģiski noārdāmi savienojumi, taču ne vienmēr attīrāmi ir visi būtībā bioloģiski noārdāmie savienojumi. Var izmantot arī abiotiskus procesus.

Kavējuma laiks:

ir laiks no inokulācijas atkrāsošanas testā līdz vismaz 10 % degradācijai. Kavējuma laiks parasti ir ļoti mainīgs rādītājs, kuram ir slikta reproducējamība.

Degradācijas laiks:

ir periods no kavējuma laika beigām līdz laikam, kamēr tiek sasniegti 90 % no maksimālā degradācijas līmeņa.

10 dienu intervāls:

10 dienas tieši pēc 10 % degradācijas sasniegšanas.

▼B

II PAPILDINĀJUMS

PIEMĒROTU SUMMĀRO PARAMETRU NOTEIKŠANA UN APRĒĶINĀŠANA

Atkarībā no izraudzītās metodes var būt vajadzīgi kādi summārie parametri. Turpmāk aprakstīta šo vērtību noteikšanas kārtība. Šo parametru izmantošana noteikta attiecīgo metožu aprakstos.

1. **Oglekļa saturs**

Testējamās vielas oglekļa saturu aprēķina pēc tās elementu sastāva vai nosaka ar elementanalīzi.

2. **Teorētiskais skābekļa patēriņš (TSP)**

Teorētisko skābekļa patēriņu (TSP) var aprēķināt, ja ir zināms elementu sastāvs vai tas noteikts ar elementanalīzi. Savienojumam

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikācijas,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

vai ar nitrifikāciju

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Ķīmiskais skābekļa patēriņš (ĶSP)**

Ķīmisko skābekļa patēriņu nosaka pēc C.6. metodes.

4. **Izšķīdušais organiskais ogleklis (IOO)**

Pēc definīcijas izšķīdušais organiskais ogleklis ir ķīmiskās vielas vai vielu maisījuma ūdenī esošais organiskais ogleklis, kas iziet caur filtru ar poru izmēru 0,45 mikrometri.

Paraugus no testēšanas traukiem izlej un nekavējoties filtrē filtrācijas aparātā, izmantojot piemērotu membrānas filtru. Filtrāta pirmos 20 ml (daudzumu var samazināt, izmantojot mazus filtrus) izlej. Oglekļa analīzei saglabā 10–20 ml tilpuma vai mazāk, ja injicē (tilpums atkarīgs no oglekļa analizatoram vajadzīgā daudzuma). IOO koncentrāciju nosaka ar organiskā oglekļa satura analizatoru, ar kuru iespējams noteikt oglekļa koncentrāciju, kas ir vienāds vai mazāks par 10 % no sākotnējās noteikšanai izmantotās IOO koncentrācijas.

Nofiltrētos paraugus, kurus nav iespējams izanalizēt tajā pašā darba dienā, var 48 stundas uzglabāt 2–4 °C temperatūrā vai –18 °C temperatūrā ilgāku laiku.

Piezīmes

Membrānfiltru hidrofilizēšanai tos parasti piesūcina ar virsmaktīvām vielām. Tāpēc filtrs var saturēt vairākus miligramus šķīstoša organiska oglekļa, kas var traucēt bioloģiskās noārdīšanas spējas noteikšanai. Virsmaktīvās vielas un citus šķīstošus organiskos savienojumus no filtriem izdala, tos trīs reizes pa vienai stundai vārot dejonizētā ūdenī. Pēc tam filtrus vienu nedēļu var glabāt ūdenī. Ja izmanto vienreizlietojamās filtrpatronas, katra to partija ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, vai no tiem neizdalās šķīstošais organiskais ogleklis.

▼B

Atkarībā no membrānfiltra veida pārbaudāmā viela uz tās var tikt saistīta absorbcijas rezultātā. Tāpēc var būt vēlams nodrošināt, lai testējamā viela netiktu adsorbēta uz filtra.

Filtrācijas vietā IOO atdalīšanai no *TOC* var izmantot 15 minūtes ilgu centrifugēšanu 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g). Metode nav droša, ja sākuma koncentrācija ir < 10 mg IOO/l, jo netiek atdalītas visas baktērijas vai arī atkārtoti izšķīst ogleklis, ko satur baktēriju plazma.

BIBLIOGRĀFIJA

— 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, p. 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), p. 169.

▼B

III PAPILDINĀJUMS

SLIKTI ŠĶĪSTOŠU VIELU BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANAS SPĒJAS NOTEIKŠANA

Nosakot bioloģiskās noārdīšanas spēju grūti šķīstošām vielām, īpaša vērība jāveltī šādiem aspektiem.

Viendabīgi parasti nerada ar paraugu ņemšanu saistītas problēmas, taču, lai izvairītos no noteikšanas kļūdām, kas saistītas ar paraugu neviendabīgumu, cietvielas ir ieteicams homogenizēt ar attiecīgi piemērotām metodēm. Īpaši uzmanība tam jāveltī, ja vajadzīgi tikai dažus miligramus lieli paraugi no vielām vai vielu maisījumiem ar augstu piemaisījumu saturu.

Noteikšanas laikā var izmantot dažādu veidu maisīšanu. Jāmaisa tikai tik daudz, lai viela būtu disperģētā stāvoklī, taču tā nekarstu, pārlieku neputotos un uz to neiedarbotos pārāk lieli bīdes spēki.

Vielas stabilas dispersijas veidošanai var izmantot emulgatoru. Testēšanas apstākļos tas nedrīkst būt baktērijām toksisks, bioloģiski degradēties vai veicināt putu veidošanos.

Uz šķīdinātājiem attiecas tādi paši kritēriji kā uz emulgatoriem.

Pārbaudāmām cietvielām nav ieteicams izmantot cietus nesējus, lai gan šādi nesēji var būt piemēroti eļļainām vielām.

Gadījumos, kad izmanto tādas palīgvielas kā emulgatori, šķīdinātāji vai nesēji, jāveic attiecīgo palīgvielu saturoša tukšā parauga analīze.

Slikti šķīstošu vielu bioloģiskās degradācijas noteikšanai var izmantot CO_2, BSP, *MITI* respirometriskās metodes.

BIBLIOGRĀFIJA

— 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 PAPILDINĀJUMS

BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS SPĒJAS NOVĒRTĒŠANA ĶĪMISKAJĀM VIELĀM, KURAS VARĒTU BŪT SĒJMATERIĀLAM TOKSISKAS

Ja, nosakot, vai ķīmiskā viela ir bioloģiski viegli noārdāma, izrādās, ka tā nav bioloģiski degradējama, ieteicams izmantot šādu procedūru, ja jāizšķir, vai tā nenoārdās vai arī kavē aļģu augšanu (*Reynolds et al*., 1987).

Jāizmanto līdzīgs vai tāds pats sējmateriāls, kā nosakot toksiskumu vai bioloģiskās noārdīšanas spēju.

Lai novērtētu ķīmisko vielu toksiskumu, kurām jau veikta bioloģiskās noārdīšanas spējas noteikšana, var būt jāizmanto dūņu respirācijas ātruma (aktīvo dūņu respirācijas inhibēšanas – Direktīva 88/302/EEK), BSP un/vai augšanas kavēšanas noteikšanas metodes vai to kombinācija.

Ja jānovērš ar toksiskumu saistītā augšanas kavēšana, testējamās vielas pārbaudāmās koncentrācijas, kuras izmanto bioloģiskās degradācijas spējas noteikšanai, nedrīkstētu būt lielākas par 1/10 no EC_{50} vērtības (mazākas par EC_{20} vērtībām), kuras noteiktas, novērtējot attiecīgās vielas toksicitāti. Savienojumiem, kuru EC_{50} vērtība pārsniedz 300 mg/l, vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas izmēģinājumos parasti toksisku iedarbību nenovēro.

Ja EC_{50} vērtības mazākas par 20 mg/l, tās turpmākajos izmēģinājumos var radīt nopietnas problēmas. Izmēģinājumiem izmanto vielas zemās koncentrācijas, kuras nosaka nepieciešamību precīzo un jutīgo noslēgto pudeļu testu vai ar ^{14}C iezīmētu materiālu. Var lietot arī aklimatizēti sējmateriālu, kas var paciest augstāku testējamās vielas koncentrāciju iedarbību. Šādā gadījumā tomēr tiek zaudēts vieglas bioloģiskās noārdīšanas spējas kritērijs.

BIBLIOGRĀFIJA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

V PAPILDINĀJUMS

AR NITRIFIKĀCIJAS RADĪTAJIEM TRAUCĒJUMIEM SAISTĪTĀ SKĀBEKĻA PATĒRIŅA KOREKCIJA

Novērtējot skābekļa uzņemšanu, nosakot pārbaudāmās vielas bioloģiskās degradācijas spēju, bet neņemot vērā nitrifikāciju, vielām, kuras nesatur slāpekli, ar to saistītās kļūdas ir nelielas (līdz 5 %) arī tad, ja amonija slāpekļa oksidēšana vidē notiek kļūdas dēļ, sajaucot testa un tukšā mēģinājuma traukus. Tomēr testējamajām vielām, kuras satur slāpekli, var rasties nopietnas kļūdas.

Ja nitrifikācija ir notikusi, bet šis process nav beidzies, reakcijas maisījumā novēroto skābekļa uzņemšanu var koriģēt par skābekļa daudzumu, kas patērēts amonija jonu oksidēšanai līdz nitrītam un nitrātam gadījumos, kad inkubācijas laikā noteiktas nitrīta un nitrāta koncentrācijas izmaiņās pēc šādiem vienādojumiem:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summārais vienādojums:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Pēc vienādojuma (1) 28 g slāpekļa amonija hlorīda (NH_4C1) veidā, oksidējoties par nitrātu, saista 96 g skābekļa, t. i., koeficients ir 3,43 (96/28). Tādā pašā veidā pēc vienādojuma (3) 28 g slāpekļa, oksidējoties par nitrātu, saista 128 g skābekļa, t. i., koeficients ir 4,57 (128/28).

Tā kā šīs reakcijas ir secīgas un notiek ar noteiktām un dažādām baktēriju sugām, nitrītu koncentrācijai ir iespējas gan paaugstināties, gan pazemināties; pēdējā gadījumā būtu jāveidojas ekvivalentai nitrātu koncentrācijai. Tādējādi skābeklis, kas patērēts nitrātu veidošanai, ir nitrātu koncentrācijas palielinājuma reizinājums ar 4,57, bet ar nitrītu veidošanos saistāmā slāpekļa patēriņš ir 3,43, reizināts ar nitrītu koncentrācijas pieaugumu vai, tā koncentrācijai samazinoties, skābekļa zudumi ir – 3,43, reizināts ar koncentrācijas samazinājumu.

Tas ir:

O_2, kas patērēts nitrātu veidošanai = 4,57 × nitrātu koncentrācijas pieaugums (4)

un

O_2, kas patērēts nitrītu veidošanai = 3,43 × nitrītu koncentrācijas pieaugums (5)

un

O_2, kas zaudēts, nitrītiem samazinoties = - 3,43 × nitrītu koncentrācijas samazinājums (6)

Tātad

O_2 patēriņš nitrifikācijas dēļ = ± 3,43 × nitrītjona koncentrācijas izmaiņas + 4,57 × nitrātjonu koncentrācijas pieaugums (7)

un tādējādi

O_2 patēriņš C oksidēšanai = kopējais novērotais patēriņš – patēriņš nitrifikācijas dēļ (8)

Ja nosaka tikai oksidēto N, nitrifikācijai patērētā skābekļa daudzumu pirmajā tuvinājumā aprēķina kā 4,75 × oksidētā n satura palielinājums.

C oksidēšanai koriģēto vērtību tad salīdzina ar TSP_{NH3}, ko aprēķina saskaņā ar 2. papildinājumu.

▼B

C.5. **DEGRADĀCIJA – BIOĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Ar šo metodi nosaka cietu vai šķidru organisko vielu bioķīmisko skābekļa patēriņu (BSP).

Pēc šīs metodes iegūtie dati attiecas uz ūdenī šķīstošām vielām; taču vismaz principā pēc tās var testēt arī gaistošas un mazšķīstošas vielas.

Šī metode izmantojama tikai tādu organisko vielu testēšanai, kurām šim nolūkam izmantotajā koncentrācijā nav inhibējošas iedarbības uz baktērijām. Ja pārbaudāmā viela nešķīst līdz testējamajai koncentrācijai, jāveic īpaši pasākumi, piemēram, testējamās vielas disperģēšanai jāizmanto ultraskaņa.

Informācija par toksiskumu attiecībā pret mikroorganismiem var noderēt, izvērtējot neviennozīmīgus rezultātus un izvēloties vajadzīgo koncentrācijas diapazonu.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Ar BSP saprot izšķīdušā skābekļa masu, kas konkrētos apstākļos nepieciešama noteikta tilpuma vielas šķīduma bioķīmiskās oksidēšanās procesa nodrošināšanai.

Iegūtos rezultātus norāda BSP gramos uz vienu gramu pārbaudītās vielas.

1.3. STANDARTVIELAS

Sējmateriāla aktivitātes pārbaudei ieteicams izmantot piemērotu standartvielu.

1.4. METODES PRINCIPS

Iepriekš noteiktu vielas daudzumu, kas izšķīdināts vai disperģēts piemērotā un labi aerētā barotnē, kas apsēta ar mikroorganismu sējmateriālu, inkubē tumsā nemainīgā apkārtējā temperatūrā.

BSP nosaka pēc izšķīdušā skābekļa koncentrācijas starpības testēšanas sākumā un beigās. Noteikšanas ilgums ir vismaz piecas dienas, bet ne vairāk par 28 dienām.

Vienlaikus paralēli jāveic tukšā parauga analīze, kurā nav pārbaudāmās vielas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

BSP noteikšanu nevar uzskatīt par pilnīgi drošu vielas biosadalīšanās rādītāju. Tā ir izmantojama tikai kā iepriekšēja pārbaude.

1.6. METODES APRAKSTS

Pārbaudāmo vielu iepriekš izšķīdina ūdenī vai disperģē, lai iegūtu BSP noteikšanai vajadzīgo koncentrāciju. Nosaka BSP pēc jebkuras piemērotas valsts vai starptautiskas standartmetodes.

▼B

2. **DATI UN IZVĒRTĒŠANA**

BSP sākotnējā šķīdumā aprēķina pēc izvēlētās standartmetodes un norāda BSP gramos uz vienu testējamās vielas gramu.

3. **PĀRSKATS**

Jānorāda izmantotā metode.

Bioķīmiskais skābekļa patēriņš ir vidējais rādītājs, kas iegūts vismaz no trim derīgiem mērījumiem.

Pārskatā jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši par testējamās vielas piemaisījumiem, agregātstāvokli, toksisko iedarbību un sastāvu, kas var ietekmēt rezultātus.

Ja izmanto piedevu, kas inhibē bioloģisko nitrifikāciju, tas jānorāda.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Standartmetožu saraksts, piemēram:

NF T 90-103: Bioķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

NBN 407: Bioķīmiskais skābekļa patēriņš.

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: Bioloģiskā skābekļa patēriņa noteikšana pēc n dienām.

▼B

C.6. **DEGRADĀCIJA – ĶĪMISKAIS SKĀBEKĻA PATĒRIŅŠ**

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Pēc šīs metodes nosaka cietu vai šķidru organisko vielu ķīmisko skābekļa patēriņu (ĶSP) iepriekš noteiktos, standartizētos laboratorijas apstākļos.

Testēšanai un rezultātu interpretācijai var būt noderīga informācija par vielas sastāvu (piemēram, organisko savienojumu halogēnsāļi, dzelzs sāļi, hlororganiskie savienojumi).

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Ķīmiskais skābekļa patēriņš raksturo vielas oksidējamību, kas ir ekvivalenta oksidējošā reaģenta skābekļa daudzumam, kuru noteiktos laboratorijas apstākļos patērē pārbaudāmā viela.

Iegūtos rezultātus norāda ĶSP gramos uz vienu gramu pārbaudītās vielas.

1.3. STANDARTVIELAS

Pārbaudot jaunu vielu, ne visos gadījumos jāizmanto standartvielas. Tās galvenokārt izmanto metožu periodiskai kalibrēšanai un dod iespēju salīdzināt pēc citas metodes iegūtus rezultātus.

1.4. METODES PRINCIPS

Iepriekš noteiktu vielas daudzumu, kas izšķīdināts vai disperģēts ūdenī, oksidē ar kālija dihromātu, divas stundas vārot koncentrētā sērskābes vidē ar atteci, par katalizatoru izmantojot sudraba sulfātu. Dihromāta atlikumu nosaka, titrējot ar standartizētu dzelzs (II) amonija sulfātu.

Testējot hloru saturošas vielas, hlorīdu traucējošās ietekmes samazināšanai pievieno dzīvsudraba sulfātu ([1]).

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

ĶSP tā noteikšanas veida dēļ ir oksidēšanās spējas rādītājs, un kā tādu to var izmantot kā praktisku paņēmienu organiskās vielas daudzuma noteikšanai.

Noteikšanu var traucēt hlorīdjoni; ĶSP noteikšanu var traucēt arī neorganiskas vielas ar reducētāju vai oksidētāju īpašībām.

Daļa ciklisko savienojumu un gaistošu vielu (piemēram, zemākās taukskābes) šīs metodes apstākļos pilnībā neoksidējas.

1.6. METODES APRAKSTS

Pārbaudāmo vielu izšķīdina vai disperģē, lai ĶSP būtu 250–600 mg/l.

([1]) Lai novērstu dzīvsudraba izplūdes vidē, šķīdumus, kuri satur dzīvsudraba sāļus, pēc lietošanas attīra.

▼B

Piezīmes

Mazšķīstošas un grūti disperģējamas vielas smalki saberzta pulvera vai šķidruma veidā daudzumā, kas atbilst apmēram 5 mg ĶSP, nosver un pārnes noteikšanas iekārtā ar ūdeni.

Bieži vien ķīmisko skābekļa patēriņu (ĶSP), jo īpaši mazšķīstošām vielām, ērtāk noteikt pēc metodes varianta, t. i., slēgtā sistēmā ar spiediena izlīdzināšanas ierīci (*H. Kelkenberg*, 1975). Bieži vien pēc šīs modifikācijas var iegūt labus rezultātus tādiem savienojumiem, piemēram, etiķskābei, kas pēc parastās metodes ir grūti analizējami. Tomēr šī metode neder piridīnam. Ja (1) noteikto kālija dihromāta koncentrāciju paaugstina līdz 0,25 N (0,0416 M), var izmantot tiešu 5–10 mg iesvaru, kas ir būtiski ūdenī mazšķīstošu vielu ĶSP noteikšanai (skatīt (2)).

Pārējos gadījumos ĶSP nosaka pēc jebkuras piemērotas valsts vai starptautiskas standartmetodes.

2. **DATU IZVĒRTĒŠANA**

Pārbaudes laikā kolbā novēroto ĶSP aprēķina pēc izvēlētās standartmetodes un norāda ĶSP gramos uz vienu testējamās vielas gramu.

3. **PĀRSKATS**

Jānorāda izmantotā standartmetode.

Ķīmiskais skābekļa patēriņš ir vidējais rādītājs, kas iegūts vismaz no trim mērījumiem. Pārskatā jāiekļauj visa informācija un piezīmes, kas attiecas uz rezultātu interpretāciju, jo īpaši – par testējamās vielas piemaisījumiem, agregātstāvokli un īpašībām (ja tādas ir zināmas), kas var ietekmēt noteikšanas rezultātus.

Ja hlorīdjonu traucējošās ietekmes samazināšanai izmanto dzīvsudraba sulfātu, tas ir jānorāda.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, Vol. 8, p. 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, p. 169.

Standartmetožu saraksts, piemēram:

NBN T 91-201: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

ISBN O 11 7512494: Piesārņotu ūdeņu un notekūdeņu ķīmiskais skābekļa patēriņš (dihromāta skaitlis).

NF T 90-101: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

DS 217 = ūdens analīze: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana.

DIN 38409-H-41: Ķīmiskā skābekļa patēriņa (ĶSP) noteikšana virs 15 mg litrā.

NEN 3235 5.3: *Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik*.

ISO 6060 Ūdens kvalitāte: Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšanas dihromāta metodes.

▼B

C.7. NOĀRDĪŠANĀS – ABIOTISKA NOĀRDĪŠANĀS: HIDROLĪZE ATKARĪBĀ NO pH

1. METODE

Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO TG 111 (2004) metodei.

1.1. IEVADS

Ķīmiskās vielas var iekļūt virszemes ūdeņos to tiešas lietošanas vai izsmidzināšanas kļūdas dēļ, no atkritumiem, ar virszemes noteci un drenu noteci, notekūdeņiem, ražošanas, sadzīves un lauksaimniecības notekūdeņiem, kā arī no atmosfēras, un minētās vielas šajos ūdeņos var pārveidoties ķīmiskos (piemēram, hidrolīze, oksidēšanās), fotoķīmiskos procesos un/vai mikroorganismu iedarbībā. Šajos norādījumos ir aprakstīta laboratorijas testēšanas metode ķīmisko vielu abiotisku hidrolītisku pārvērtību noteikšanai ūdens vidē parasti sastopamo pH vērtību intervālā (pH 4–9), un šie norādījumi pamatojas uz attiecīgajiem norādījumiem par testēšanu, kas minēti (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

Eksperimentāli nosaka: i) testējamās vielas hidrolīzes ātrumu atkarībā no pH, un ii) to hidrolīzes produktu identitāti vai īpašības, veidošanās un noārdīšanās ātrumu, kuru iedarbībai var tikt pakļauti organismi. Šie pētījumi var būt nepieciešami par ķīmiskajām vielām, kuras tiek ievadītas tieši ūdenī, vai arī ir iespējams, ka tās nokļūst vidē kādā citā no iepriekš minētajiem veidiem.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Skatīt 2. papildinājumu.

1.3. METODES PIEMĒROTĪBA

Metode ir vispār piemērota ķīmiskajām vielām (ar radioizotopiem iezīmētām un neiezīmētām), kuru noteikšanai ir piemērota analītiska metode, kas nodrošina pietiekamu pareizību un jutību. Šī testēšanas metode ir izmantojama nedaudz gaistošiem un negaistošiem savienojumiem ar pietiekamu šķīdību ūdenī. Testēšanas metodi nav ieteicams izmantot ķīmiskajām vielām, kurām ir liela gaistamība no ūdens (t. i., fumiganti, organiskie šķīdinātāji), un tāpēc šīs vielas eksperimenta apstākļos nevar aizturēt šķīdumā. Var gadīties, ka testēšana būs apgrūtināta, ja vielai ir minimāla šķīdība ūdenī (8).

1.4. METODES PRINCIPS

Steriliem ūdens buferšķīdumiem ar atšķirīgu pH vērtību (pH 4, 7 un 9) pievieno testējamo vielu un iztur tumsā kontrolējamos laboratorijas apstākļos (pastāvīgā temperatūrā). Pēc noteiktiem laika intervāliem buferšķīdumus analizē, nosakot attiecīgās testējamās vielas un to hidrolīzes produktu saturu. Testējamo vielu iezīmējot ar radioizotopu (piemēram, ^{14}C), var vienkāršāk noteikt masas bilanci.

Šajā testēšanas metodē paredzēts izmantot pakāpeniskas testēšanas pieeju, tā ir norādīta un izskaidrota 1. papildinājumā. Katrā nākamajā testēšanas posmā izmanto iepriekšējā posmā iegūtos rezultātus.

▼B

1.5. INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Hidrolīzes ātruma noteikšanai var izmantot neiezīmētu vai ar radioizotopiem iezīmētu testējamo vielu. Iezīmētā viela parasti būtu jāizvēlas, pētot hidrolīzes gaitu un nosakot masas bilanci; tomēr īpašos gadījumos varētu būt, ka iezīmēšana nav absolūti nepieciešama. Ieteicams iezīmēšanai izmantot ^{14}C izotopu, bet var būt lietderīgi izmantot arī citus radioizotopus, piemēram, ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Ja iespējams, jāiezīmē molekulas stabilākās daļas. Piemēram, ja testējamās vielas struktūrā ir viens aromātiskais gredzens, jāiezīmē šis gredzens; ja ir divi vai vairāki šādi gredzeni, tad iespējams, ka vajadzēs atsevišķi pētīt katra iezīmētā aromātiskā gredzena pārvērtības, lai iegūtu attiecīgo informāciju par hidrolīzes produktu veidošanos. Testējamās vielas tīrības pakāpei jābūt vismaz 95 %.

Pirms hidrolīzes testa par testējamo vielu jāiegūst šāda informācija:

a) šķīdība ūdenī (A.6. testēšanas metode);

b) šķīdība organiskajos šķīdinātājos;

c) tvaika spiediens (A.4. testēšanas metode) un/vai Henrija konstante;

d) sadalījuma koeficients n-oktanolā/ūdenī (A.8. testēšanas metode);

e) disociācijas konstante (pKa) (ESAO TG 112 metode) (9);

f) tiešās un netiešās fotolīzes ātrums ūdenī, kur nepieciešams.

Jābūt izmantojamām analītiskām metodēm testējamās vielas un, attiecīgos gadījumos, tās hidrolīzes produktu kvantitatīvai noteikšanai un identifikācijai ūdens šķīdumos (skatīt arī 1.7.2. punktu).

1.6. STANDARTVIELAS

Ja iespējams, standartvielas jāizmanto hidrolīzes produktu identifikācijai un kvantitatīvai noteikšanai ar spektroskopijas un hromatogrāfijas metodēm vai citām metodēm ar pietiekamu jutību.

1.7. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.7.1. **Atgūstamība**

Vismaz divu buferšķīduma vai to ekstrakta šķīduma analīze divos atkārtojumos tūlīt pēc testējamās vielas pievienošanas dod pirmās liecības par analītiskās metodes atkārtojamību un attiecīgās procedūras vienveidību. Atgūstamību nākamajiem testēšanas posmiem nosaka pēc attiecīgajām masas bilancēm (ja lieto iezīmētu vielu). Gan iezīmētām, gan neiezīmētām vielām atgūstamībai jābūt no 90 % līdz 110 % (7). Ja tehnisku iemeslu dēļ to panākt grūti, neiezīmētām vielām pieņemama arī atgūstamība 70 % līmenī, bet tas jāpamato.

▼B

1.7.2. **Analītiskās metodes atkārtojamība un jutība**

Testējamās vielas un tās hidrolīzes produktu kvantitatīvai noteikšanai izmantojamās analītiskās metodes atkārtojamību var pārbaudīt ar to pašu buferšķīdumu (vai to ekstraktu) dublikātu paraugu analīzi pēc tam, kad hidrolīzes produkti ir izveidojušies kvantitatīvai noteikšanai pietiekamā daudzumā.

Analītiskajai metodei jābūt pietiekami jutīgai, lai noteiktu testa vielas koncentrācijas līdz pat 10 % vai mazāk no sākotnējās koncentrācijas. Ja vajadzīgs, analītiskajām metodēm jābūt arī pietiekami jutīgām, lai noteiktu hidrolīzes produktu daudzumā 10 % vai vairāk no lietotā daudzuma (jebkurā momentā eksperimenta gaitā) līdz pat 25 % vai mazāk no tā maksimālās koncentrācijas.

1.7.3. **Hidrolīzes kinētikas datu ticamības intervāli**

Ticamības intervāli jāaprēķina un jānorāda visiem regresijas koeficientiem, ātruma konstantēm, pussadalīšanās laikiem un citiem kinētikas datiem (piemēram, DT50).

1.8. TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

1.8.1. **Iekārtas un aparatūra**

Pētījumi jāveic stikla traukos (piemēram, mēģenēs, nelielās kolbās), ja nepieciešams, tumsā sterilos apstākļos, izņemot gadījumus, kad iepriekšējie dati (piemēram, sadalījuma koeficients n-oktanolā–ūdenī) nenorāda, ka testējamā viela var pielipt pie stikla. Šādos gadījumos jāapsver citu materiālu (piemēram, teflona) izmantošana. Iespējams, ka pielipšanas problēmu varētu novērst, izmantojot kādu vai vairākas šādas metodes:

— uz testēšanas trauka sieniņām adsorbētās testējamās vielas un hidrolīzes produktu masas noteikšana,

— ultraskaņas vannas izmantošana,

— visu stikla trauku mazgāšana ar šķīdinātāju pēc katras paraugu ņemšanas reizes,

— preparātu izmantošana,

— palielināta papildšķīdinātāja daudzuma izmantošana testējamās vielas ievadīšanai sistēmā; ja izmanto papildšķīdinātāju, tas nedrīkst izraisīt testējamās vielas hidrolīzi.

Parasti ir nepieciešami ūdens vannas kratītāji ar temperatūras regulēšanu vai termostati dažādu testējamo šķīdumu inkubācijai.

Nepieciešamas standarta laboratorijas iekārtas, ieskaitot šādas:

— pH-metrs,

▼B

— tādi analītiskie instrumenti kā gāzes hromatogrāfijas, *HPLC* hromatogrāfijas, plānslāņa hromatogrāfijas iekārta, ieskaitot detektēšanas iekārtu, kas piemērota ar radioizotopiem iezīmēto un neiezīmēto materiālu analīzei vai inversajai izotopu atšķaidīšanas metodei,

— instrumenti identifikācijai (piemēram, MS, GC-MS, *HPLC*-MS, KMR u. c.),

— šķidruma scintilācijas skaitītājs,

— šķirpiltuves šķidrumu ekstrakcijai,

— aparatūra šķīdumu un ekstraktu koncentrēšanai (piemēram, rotācijas iztvaicētājs),

— iekārta ar temperatūras kontroli (piemēram, ūdens vanna).

Pie nepieciešamajiem ķīmiskajiem reaģentiem pieder, piemēram:

— analītiskās tīrības organiskie šķīdinātāji, piemēram, heksāns, dihlormetāns u. c.,

— scintilācijas šķidrums,

— buferšķīdumi (sīkāk skatīt 1.8.3. punktā).

Visi hidrolīzes testā izmantojamie stikla trauki, analītiski tīrs ūdens un buferšķīdumi jāsterilizē.

1.8.2. **Testējamās vielas pievienošana**

Testējamā viela buferšķīdumiem (skatīt 3. papildinājumu) jāpievieno ūdens šķīdumu veidā. Ja nepieciešams, testējamās vielas pilnīgai izšķīdināšanai un sajaukšanai nelielā daudzumā var izmantot šķīdinātājus, kas sajaucas ar ūdeni (piemēram, acetonitrilu, acetonu, etanolu), parasti to tilpuma daļai nepārsniedzot 1 %. Ja jāizmanto šķīdinātāji augstākās koncentrācijās (piemēram, ja testējamā viela ir mazšķīstoša), tas pieļaujams tikai tad, ja var uzskatāmi parādīt, ka šķīdinātājam nav nekādas ietekmes uz testējamo vielu hidrolīzi.

Produkta preparātus parasti nav ieteicams izmantot, jo nevar izslēgt, ka to sastāvdaļas neietekmē hidrolīzes procesu. Tomēr, ja testējamā viela slikti šķīst ūdenī vai pielīp pie stikla (skatīt 1.8.1. punktu), preparāta izmantošana varētu būt pieņemama alternatīva.

Jāizmanto viena testējamās vielas koncentrācija; šī koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,01 M vai pusi no piesātināta šķīduma koncentrācijas (skatīt 1. papildinājumu).

▼B

1.8.3. **Buferšķīdumi**

Hidrolīzes tests jāveic pie pH vērtībām 4, 7 un 9. Šim nolūkam jāgatavo buferšķīdumi no analīžu veikšanai piemērotas tīrības klases vielām (*reagent grade*) un ūdens. Dažas ieteicamās bufersistēmas ir minētas 3. papildinājumā. Jāņem vērā, ka izmantotais buferšķīdums var ietekmēt hidrolīzes ātrumu, un šādos gadījumos jālieto cits buferšķīdums.

Buferšķīdumu pH jāmēra, izmantojot kalibrētu pH-metru, ar precizitāti vismaz 0,1 nepieciešamajā temperatūrā.

1.8.4. **Testēšanas apstākļi**

1.8.4.1. *Testēšanas temperatūra*

Hidrolīzes pētījumi jāveic pastāvīgā temperatūrā. Ekstrapolācijai ir svarīgi temperatūru uzturēt ar precizitāti vismaz ± 0,5 °C.

Iepriekšējais tests (1. posms) jāveic 50 °C temperatūrā, ja testējamās vielas hidrolīzes raksturlielumi nav zināmi. Nākamo posmu kinētiskie testi jāveic vismaz trijās temperatūrās (ieskaitot 50 °C temperatūru), izņemot gadījumus, kad testējamā viela saskaņā ar testēšanas pirmajā posmā iegūtajiem rezultātiem ir stabila pret hidrolīzi. Ieteicamais temperatūras diapazons ir 10–70 °C (turklāt ieteicams, lai vismaz viena no izmantotajām temperatūrām būtu zemāka par 25 °C), iekļaujot pārskatā norādāmo standarta apstākļu temperatūru 25 °C un vidē sastopamo temperatūru intervāla lielāko daļu.

1.8.4.2. *Gaisma un skābeklis*

Veicot hidrolīzes testus, ar jebkādu piemērotu metodi jānovērš iespējamā fotolīze. Jāveic arī visi iespējamie pasākumi skābekļa iedarbības novēršanai (piemēram, 5 min barbotējot hēliju, slāpekli vai argonu pirms šķīduma sagatavošanas).

1.8.4.3. *Testēšanas ilgums*

Orientējošais tests jāveic piecas dienas, bet nākamajos posmos testi jāveic, līdz hidrolizējas 90 % testējamās vielas, vai 30 dienas atkarībā no tā, kurš no šiem laika periodiem ir īsāks.

1.8.5. **Testēšanas veikšana**

1.8.5.1. *Orientējošais tests (1. posms)*

Orientējošo testu veic 50 ± 0,5 °C temperatūrā pie pH 4, 7 un 9. Ja pēc piecām dienām ($t_{0,525}{}^{o}{}_{C}$ > 1 gads) hidrolizējušies mazāk nekā 10 % vielas, testējamā viela uzskatāma par hidrolītiski stabilu un turpmāku testēšanu parasti nav nepieciešams veikt. Ja ir zināms, ka testējamā viela ir nestabila vidē sastopamās temperatūrās, orientējošais tests nav jāveic. Analītiskajai metodei jābūt ar pietiekamu precizitāti un jutību, lai varētu konstatēt sākotnējās koncentrācijas samazinājumu par 10 %.

▼B

1.8.5.2. *Nestabilu vielu hidrolīze (2. posms)*

Nākamajā posmā testēšana jāveic pie tām pH vērtībām, kurās iepriekš orientējošā testā konstatēta testējamās vielas nestabilitāte. Testējamās vielas buferšķīdumi jāiztur termostatā izraudzītajās temperatūrās. Lai noteiktu pirmās kārtas reakcijas, visi šķīdumi jāanalizē laika intervālos, kas nodrošina vismaz sešus attālinātus datu punktus, parasti no 10 % līdz 90 % no testējamās vielas hidrolīzes. Atsevišķie atkārtojumi (minimālais atkārtojumu skaits ir divi paraugi atsevišķos reakcijas traukos) jāņem un saturs jāizanalizē pēc katra no vismaz sešiem paraugu ņemšanas laikiem (iegūstot vismaz divpadsmit atkārtojumu datu punktus). Viena apvienota parauga izmantošana, no kura katrā paraugu ņemšanas termiņā ņem atsevišķas pārbaudāmā šķīduma alikvotas, uzskatāma par neatbilstošu paņēmienu, jo tādējādi nav iespējams veikt datu izkliedes analīzi un var rasties problēmas, kas saistītas ar testējamā šķīduma kontaminmāciju. Sterilitātes apstiprināšanas testi jāveic pēdējā posma testa beigās (t. i., pie 90 % hidrolīzes vai pēc 30 dienām). Tomēr, ja netiek novērota vielas noārdīšanās (t. i., pārveidošanās), sterilitātes testi nav uzskatāmi par nepieciešamiem.

1.8.5.3. *Hidrolīzes produktu identifikācija (3. posms)*

Jebkādi nozīmīgāki hidrolīzes produkti, vismaz tie, kas reprezentē > 10 % no lietotās devas, jāidentificē ar piemērotām analītiskajām metodēm.

1.8.5.4. *Fakultatīvie testi*

Papildu testi pie citām pH vērtībām, izņemot 4, 7 un 9, var būt jāveic gadījumos, kad testējamā viela ir hidrolītiski nestabila. Piemēram, fizioloģijā var būt jāveic testēšana skābākā vidē (piemēram, pie pH 1,2) vienā fizioloģiskajiem procesiem atbilstošajā temperatūrā (37 ^{o}C).

2. **DATI**

Ja nepieciešams, testējamās vielas un hidrolīzes produktu daudzumi jānorāda procentos no lietotās sākotnējās koncentrācijas un, ieteicams, koncentrāciju (mg/L) veidā katram paraugu ņemšanas termiņam, pH un testēšanas temperatūrai. Bez tam jānorāda masas bilance procentos no lietotās sākotnējās koncentrācijas, ja testējamā viela iezīmēta ar izotopiem.

Datiem par testējamās vielas koncentrācijas izmaiņām laikā jāveic logaritmiskie pārveidojumi, un tie jāattēlo grafiski atkarībā no laika. Jāidentificē nozīmīgākie hidrolīzes produkti, vismaz tie, kas reprezentē > 10 % no lietotās devas, un to koncentrācijas pēc logaritmiskiem pārveidojumiem arī jāattēlo grafiski līdzīgā veidā kā par testējamo vielu, lai parādītu to veidošanās un noārdīšanās ātrumus.

▼B

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Precīzākas pussadalīšanās vai DT_{50} vērtības jāiegūst, izdarot aprēķinus pēc atbilstoša kinētiskā modeļa. Pussadalīšanās un/vai DT_{50} vērtības (kopā ar ticamības līmeņiem) jānorāda visām pH un temperatūras vērtībām kopā ar izmantotā modeļa aprakstu, kinētikas kārtu un determinācijas koeficientu (r^2). Ja vajadzīgs, aprēķini jāveic arī par hidrolīzes produktiem.

Ja hidrolīzes ātrumu nosaka dažādās temperatūrās, šķietamās pirmās kārtas hidrolīzes ātruma konstantes (k_{obs}) jānosaka kā temperatūras funkcija. Aprēķinam jāpamatojas gan uz k_{obs} sadalīšanu ātruma konstantēs skābes katalizētai hidrolīzei, hidrolīzei neitrālā vidē un bāzes katalizētai hidrolīzei (attiecīgi k_H, $k_{neutral}$, un k_{OH}), gan uz Areniusa vienādojumu:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kur Ai un Bi ir attiecīgi regresijas vienādojuma brīvais loceklis un virziena koeficients ln ki lineārajai regresijai atkarībā no absolūtās temperatūras kelvinos (K) apgrieztās vērtības. Izmantojot Areniusa vienādojumu skābes katalizētai hidrolīzei, hidrolīzei neitrālā vidē un bāzes katalizētai hidrolīzei, var aprēķināt šķietamās pirmās kārtas hidrolīzes reakcijas ātruma konstantes un tādējādi – arī pussadalīšanās laikus citās temperatūrās, kurām ātruma konstantes eksperimentāli noteikt nav iespējams (10).

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Vairums hidrolīzes reakciju norisinās ar šķietamās pirmās kārtas reakciju ātrumu, un tāpēc pussadalīšanās laiks nav atkarīgs no koncentrācijas (skatīt 4. vienādojumu 2. papildinājumā). Tas parasti ļauj rezultātus, kas iegūti laboratorijā koncentrācijām no 10^{-2} līdz 10^{-3} M, attiecināt uz vides apstākļiem ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Ja nosaka gan pH, gan temperatūru, vairākus piemērus tam, ka pastāv laba sakritība hidrolīzes ātrumiem, kas noteikti tīrā un dabiskā ūdenī, par daudzām ķīmiskajām vielām aprakstījuši *Mabey* un *Mill* (11).

3. **PĀRSKATS**

3.1. TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Testēšanas pārskatā jāiekļauj vismaz šāda informācija.

Testējamā viela:

— ikdienas nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula (norādot iezīmēto vietu, ja lieto ar radioizotopu iezīmētu vielu) un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības (skatīt 1.5. punktu),

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi),

— iezīmētās vielas iezīmes tīrība un molārā aktivitāte (kur piemērojams).

▼B

— Buferšķīdumi:

— gatavošanas datumi un ziņas par pagatavošanu,

— izmantotās bufervielas un ūdens,

— buferšķīdumu molārā koncentrācija un pH.

Testēšanas apstākļi:

— pētījumu veikšanas datumi,

— izmantotais testējamās vielas daudzums,

— testējamās vielas lietošanai izmantotā metode un šķīdinātāji (veids un daudzums),

— inkubēto testējamās vielas buferšķīdumu tilpums,

— izmantotās inkubācijas sistēmas apraksts,

— pH un temperatūra pētījuma laikā,

— paraugu ņemšanas laiki,

— ekstrakcijas metodes,

— testējamās vielas un tās hidrolīzes produktu daudzuma noteikšanas un identifikācijas metodes buferšķīdumos,

— atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

— izmantoto analītisko metožu atkārtojamība un jutība,

— atgūstamība (% vērtības derīgiem pētījumu rezultātiem norādītas 1.7.1. punktā),

— tabulā apkopoti dati par atkārtojumiem un to vidējās vērtības,

— masas bilance pētījuma laikā un pētījuma beigās (ja lieto iezīmētu testējamo vielu),

— orientējošā pētījuma rezultāti,

— rezultātu novērtējums un interpretācija,

— visi oriģinālie dati un skaitļi.

Ja nosaka hidrolīzes ātrumu, ir nepieciešama tikai šāda informācija:

— koncentrācijas grafiki atkarībā no laika (testējamajām vielām un, attiecīgos gadījumos, hidrolīzes produktiem) pie katras pH vērtības un temperatūras,

— Areniusa vienādojuma rezultātu tabulas temperatūrai 20 °C/25 °C, norādot pH, ātruma konstanti (h^{-1} vai $dienā^{-1}$), pussadalīšanās laiku vai DT_{50}, temperatūras (°C), ieskaitot ticamības līmeņus un determinācijas koeficientus (r^2), vai citu līdzīgu informāciju,

— iespējamā hidrolīzes gaita.

▼B

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(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.

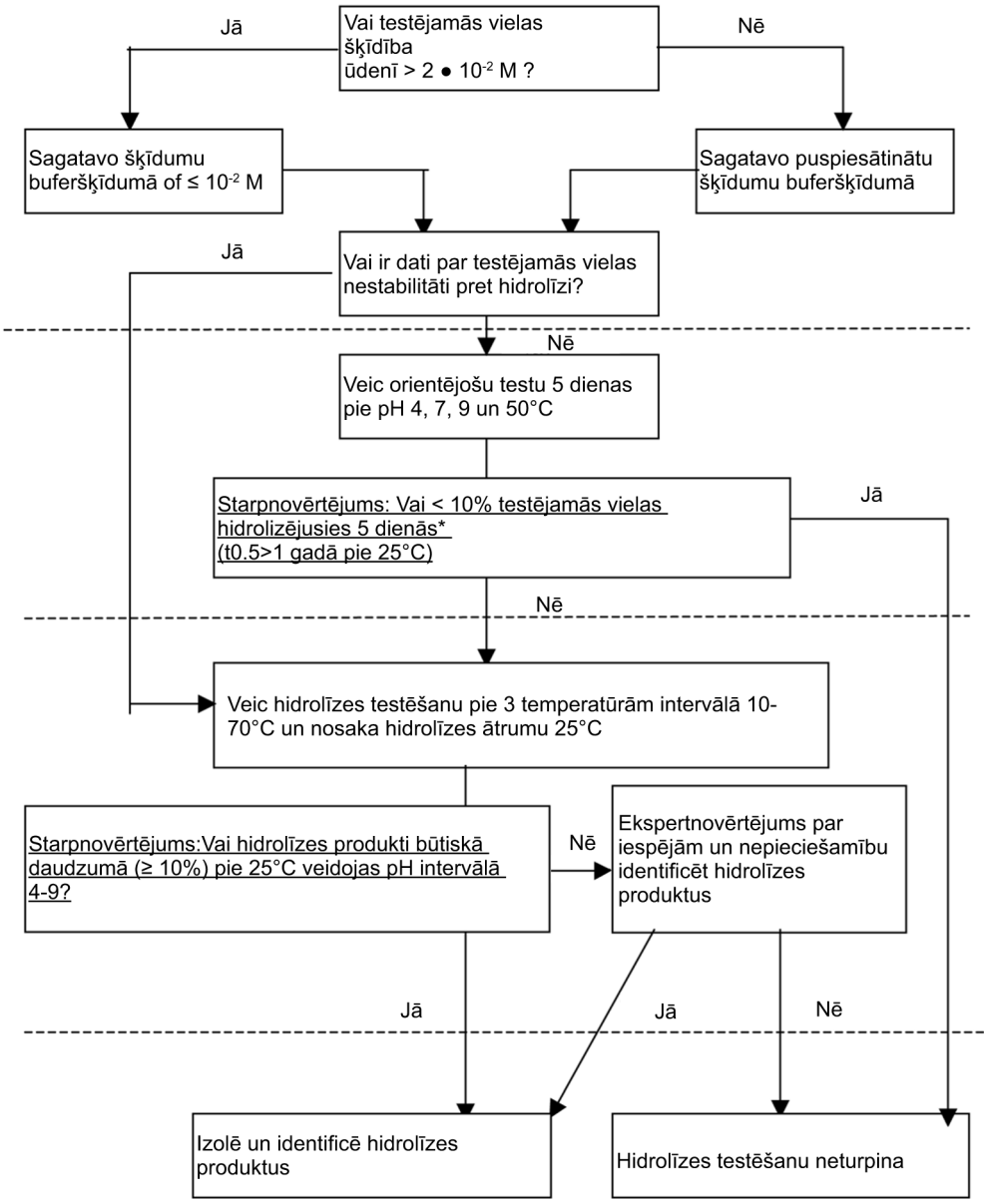
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(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, p. 383–415.

▼B

1. PAPILDINĀJUMS

Hidrolīzes pakāpeniskas testēšanas shēma



* Testējamās vielas 10% hidrolīze pie 50°C atbilst apmēram 30 dienu pussadalīšanās periodam, kas savukārt atbilst aptuveni 1 gadam 25°C temperatūrā.

▼B

2. PAPILDINAJUMS

Definīcijas un mērvienības

Jāizmanto tikai standarta starptautiskās sistēmas mērvienības (SI).

Testējamā viela: viela, sākotnējais savienojums vai tās transformācijas produkti.

Pārveidošanās produkti: visas vielas, kas rodas testējamās vielas biotiskas vai abiotiskas transformācijas rezultātā.

Hidrolīzes produkti: visas vielas, kas rodas testējamās vielas hidrolītiskas transformācijas reakcijās.

Hidrolīze: testējamās vielas RX reakcija ar ūdeni, kurā notiek X- grupas apmaiņas reakcija OH- grupu reakcijas centrā:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Ātrumu, pie kura RX koncentrācija samazinās šajā vienkāršotajā procesā, apraksta

ātrums = $k\ [H_2O]\ [RX]$ otrās kārtas reakcijām

vai

ātrums = $k\ [RX]$ pirmās kārtas reakcijām

atkarībā no ātruma noteikšanas posma. Ūdens ir lielā pārākumā salīdzinājumā ar testējamo vielu, tāpēc šā tipa reakcijas parasti apraksta kā šķietamās pirmās kārtas reakcijas, kurām novēroto ātruma konstanti apraksta sakarība

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

un to var aprēķināt pēc šāda vienādojuma

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kur

t = laiks

un C_o, C_t = RX koncentrācijas laikā 0 un t.

Šīs konstantes mērvienības ir $(laiks)^{-1}$, un reakcijas pussadalīšanās laiku (laiks, kas nepieciešams, lai izreaģētu 50 % no RX daudzuma) apraksta ar vienādojumu

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Pussadalīšanās laiks: ($t_{0,5}$) ir laiks, kas nepieciešams, lai hidrolizētos 50 % no testējamās vielas daudzuma, ja reakciju var aprakstīt ar pirmās kārtas kinētiku; tas nav atkarīgs no koncentrācijas.

▼B

DT_{50} (izzušanas laiks 50): laiks, kurā testējamās vielas koncentrācija samazināts par 50 %; tas atšķiras no pussadalīšanās laika $t_{0,5}$, ja reakcija nenotiek atbilstoši pirmās kārtas reakciju kinētikai.

Ātruma konstantes k noteikšana dažādās temperatūrās

Ja ātruma konstantes ir zināmas divām temperatūrām, tad ātruma konstantes citās temperatūrās var aprēķināt pēc Areniusa vienādojuma:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ vai } \ln\ k = \frac{-\mathrm{E}}{R \times T} + \ln\ A$$

ln k grafiks atkarībā no 1/T ir taisne ar virziena koeficientu – E/R

kur:

k = ātruma konstante dažādās temperatūrās,

E = aktivācijas enerģija (kJ/mol),

T = absolūtā temperatūra (K),

R = universālā gāzu konstante (8,314 J/mol.K).

Aktivācijas enerģiju nosaka ar regresijas analīzi vai aprēķina pēc šāda vienādojuma:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kur: $T_2 > T_1$.

▼B

3. PAPILDINĀJUMS

Bufersistēmas

A. **CLARK un LUBS:**

KLĀRKA un LUBSA bufermaisījumi [1]

Sastāvs	pH
0,2 N HCl UN 0,2 N KCl 20 °C TEMPERATŪRĀ	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, atšķaida līdz 100 ml	2,2
0,1 M kālija biftalāts + 0,1 N HCl 20 °C TEMPERATŪRĀ	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	3,8
0,1 M kālija biftalāts + 0,1 N NaOH 20 °C TEMPERATŪRĀ	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	4,8

[1] Šajās tabulās minētie pH lielumi ir aprēķināti no iespējamo vērtību mērījumiem, izmantojot Sērensena standarta vienādojumu (1909). Atbilstošās pH vērtības ir par 0,04 vienībām augstākas par tabulā norādītajām vērtībām.

▼B

Sastāvs	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalāta, atšķaida līdz 100 ml	6,0

KLĀRKA un LUBSA bufermaisījumi (turpinājums)

0,1 M monokālija fosfāts + 0,1 N NaOH 20 °C TEMPERATŪRĀ	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfāta, atšķaida līdz 100 ml	8,0
0,1 M $H_3B0_3$0,1 M KCl šķīdumā + 0,1 N NaOH 20 °C TEMPERATŪRĀ	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borskābes, atšķaida līdz 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF un VLEESCHHOUWER:**

KOLTHOFA un FLEŠHAUVERA citrāta buferšķīdumi

Sastāvs	pH
0,1 M monokālija citrāta un 0,1 N HCl 18 °C temperatūrā	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	3,6
0,1 M monokālija citrāta un 0,1 N NaOH 18 °C temperatūrā	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrāta, atšķaida līdz 100 ml	6,0

▼B

C. **SÖRENSEN:**

SĒRENSENA borāta maisījumi

Sastāvs		Sörensen 18 °C	Walbum, pH		
ml, boraka	HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraks + 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 boraks + 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

SĒRENSENA fosfātu maisījumi

Sastāvs	pH
0,0667 M monokālija fosfāts + 0,0667 M dinātrija fosfāts 20 °C temperatūrā	
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. **TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA SLIEKĀM**

MĀKSLĪGĀS AUGSNES TESTS

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šajā laboratoriskajā pārbaudē pārbaudāmo vielu pievieno mākslīgai augsnei, kurā uz 14 dienām ievieto sliekas. Pēc šā laika posma (un vajadzības gadījumā pēc septiņām dienām) pēta attiecīgās vielas nāvējošo ietekmi uz sliekām. Ar šā testa metodi var relatīvi īsā laikā izpētīt ķimikāliju ietekmi uz sliekām saistībā ar šo vielu uzņemšanu caur ādu un ar barību.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

LC_{50} (vidējā letālā koncentrācija): vielas koncentrācija, kas testa laikā nogalina 50 % testa dzīvnieku.

1.3. STANDARTVIELA

Standartvielu izmanto regulāri, lai parādītu, ka testa sistēmas jutība nav būtiski mainījusies.

Ieteicamā standartviela ir analītiski tīrs hloracetamīds.

1.4. TESTA PRINCIPS

Augsne ir mainīga vide, tādēļ šajā testā izmanto smilšmālu, kura sastāvs ir rūpīgi definēts. Pieaugušas *Eisenia foetida* sugas sliekas (skatīt piezīmi papildinājumā) tur noteiktā mākslīgajā augsnē, kuru apstrādā ar pārbaudāmo vielu dažādās koncentrācijās. Konteineru saturu 14 dienas (un vajadzības gadījumā septiņas dienas) pēc testa sākuma izklāj uz paplātes un saskaita izdzīvojušās sliekas pie katras koncentrācijas.

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Tests izstrādāts tā, lai tas būtu pēc iespējas precīzāk reproducējams testa substrāta un testa organismu ziņā. Mirstība kontrolsubstrātā testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 %, citādi testa rezultāti ir nederīgi.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. *Materiāli*

1.6.1.1. Testa substrāts

Testa pamatsubstrāts ir mākslīgā augsne ar noteiktu sastāvu.

a) Pamatsubstrāts (norādīts sausnas procentuālais sastāvs)

— 10 % sfagnu kūdras (pēc iespējas tuvāk pH vērtībai robežās no 5,5 līdz 6,0, bez redzamām augu atliekām, smalka maluma),

▼B

— 20 % kaolinīta māla, kura sastāvā, vēlams, ir vairāk nekā 50 % kaolinīta,

— apmēram 69 % rūpniecisko kvarca smilšu (pārsvarā smalkā smilts, kurā vairāk nekā 50 % daļiņu ir izmērā no 0,05 līdz 0,2 mm). Ja vielas dispersija ūdenī ir nepietiekoša, uz katru testa konteineru vajadzētu būt pieejamiem 10 g vielas, kas paredzēti vēlākai iejaukšanai pārbaudāmā vielā,

— apmēram 1 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$), kas ir pulverizēts, ķīmiski tīrs un pievienots, lai pH vērtība būtu 6,0 ± 0,5.

b) Testa substrāts

Testa substrāta sastāvā ir pamatsubstrāts, pārbaudāmā viela un dejonizēts ūdens.

Ūdens saturs ir apmēram 25 līdz 42 % no pamatsubstrāta sausnas. Substrāta ūdens saturu nosaka, izžāvējot paraugu līdz nemainīgam svaram 105 °C temperatūrā. Galvenais kritērijs mākslīgās augsnes samitrināšanā ir tāds, ka samitrinātajā augsnē nav stāvoša ūdens. Maisot jānodrošina pārbaudāmās vielas vienmērīga izplatība substrātā. Jānorāda, kāds paņēmiens izmantots, lai pārbaudāmo vielu iemaisītu substrātā.

c) Kontrolsubstrāts

Kontrolsubstrāts sastāv no pamatsubstrāta un ūdens. Ja izmanto kādu piedevu, tad jābūt papildu kontrolsubstrātam, kura sastāvā ir tāds pats daudzums minētās piedevas.

1.6.1.2. Testa konteineri

Stikla konteineri ar tilpību aptuveni viens litrs (pienācīgi nosegti ar plastmasas vākiem, šķīvjiem vai plastmasas plēvi, kurā ir caurumi ventilācijai), piepildīti ar tādu mitra testa substrāta vai kontrolsubstrāta daudzumu, kas ir līdzvērtīgs 500 g substrāta sausnas.

1.6.2. *Testa apstākļi*

Konteineri jātur klimata kontroles kamerā 20 ± 2 °C temperatūrā un pastāvīgā apgaismojumā. Gaismas intensitātei jābūt no 400 līdz 800 luksiem.

Testa ilgums ir 14 dienas, bet vajadzības gadījumā mirstību var novērtēt arī septiņas dienas pēc testa sākuma.

1.6.3. *Testa metode*

Testa koncentrācijas

Pārbaudāmās vielas koncentrāciju izsaka ar vielas svaru uz pamatsubstrāta sausnas vienību (mg/kg).

Iedarbības diapazona noteikšana

To koncentrāciju diapazonu, kas izraisa mirstību 0 līdz 100 % apmērā, var noskaidrot ar iedarbības diapazona noteikšanas testu, šādi iegūstot informāciju par galīgajā testā izmantojamo koncentrāciju diapazonu.

▼B

Viela jātestē šādās koncentrācijās: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg vielas uz kilogramu testa substrāta (sausna).

Ja paredzēts veikt pilnīgu galīgo testu, tad iedarbības diapazona noteikšanas testā pietiek ar vienu testa partiju katrai koncentrācijai un vienu neapstrādātu kontrolpartiju, kur katrā partijā ir 10 sliekas.

Galīgais tests

Iedarbības diapazona noteikšanas testa rezultātus izmanto, lai atlasītu vismaz piecas ģeometrisku sēriju veidojošas koncentrācijas, kas izraisa mirstību 0 līdz 100 % apmērā un viena no otras atšķiras ar nemainīga lieluma faktoru, kurš nepārsniedz 1,8.

Ar testiem, kuros izmanto šādas koncentrāciju sērijas, vajadzētu spēt noteikt LC_{50} vērtību un tās ticamības robežas tik precīzi, cik vien tas iespējams.

Galīgajā testā izmanto vismaz četras testa partijas katrai koncentrācijai un četras neapstrādātas kontrolpartijas, kur katrā ir 10 sliekas. No šīm partijām iegūtos rezultātus uzrāda kā vidējo vērtību un standartnovirzi.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kuru attiecība ir 1,8, izraisa tikai 0 % un 100 % mirstību, tad pietiek ar šīm divām vērtībām, lai noteiktu diapazonu, kam atbilst LC_{50} vērtība.

Testa pamatsubstrāta un pārbaudāmās vielas maisījums

Testa substrātu, ja iespējams, sagatavo, neizmantojot papildu aktīvās vielas, bet tikai ūdeni. Tieši pirms testa sākuma pārbaudāmās vielas emulsiju vai dispersiju dejonizētā ūdenī vai citā šķīdinātājā iemaisa testa pamatsubstrātā vai vienmērīgi izsmidzina uz tā virsmas, izmantojot smalku hromatogrāfisku vai tamlīdzīgu smidzinātāju.

Ja pārbaudāmā viela nešķīst ūdenī, to var izšķīdināt pēc iespējas mazākā tilpumā piemērota organiska šķīdinātāja (piemēram, heksāna, acetona vai hloroforma).

Pārbaudāmās vielas šķīdināšanai, disperģēšanai vai emulģēšanai drīkst izmantot tikai tādas aktīvās vielas, kas tūlīt izgaist. Testa substrāts pirms izmantošanas jāventilē. Iztvaikojušā ūdens daudzums jāaizstāj. Ja izmanto papildu aktīvās vielas, tad kontrolpartijā tām jābūt tikpat lielā daudzumā.

Ja pārbaudāmā viela nav izšķīdināma, disperģējama vai emulģējama organiskos šķīdinātājos, tad 10 g maisījuma, kas sastāv no smalkas kvarca smilts un tāda pārbaudāmās vielas daudzuma, kas vajadzīgs, lai apstrādātu 500 g mākslīgās augsnes sausnas, samaisa ar 490 g testa substrāta sausnas.

Testa partiju veido, ievietojot stikla konteinerā tādu daudzumu mitra testa substrāta, kas atbilst 500 g sausnas, un uz šā testa substrāta virsmas uzliekot 10 sliekas, kuras 24 stundas ir kondicionētas līdzvērtīgā mitrā pamatsubstrātā un pēc tam ātri nomazgātas, pirms slieku izmantošanas lieko ūdeni nosusinot ar filtrpapīru.

▼B

Konteinerus pārsedz ar perforētiem plastmasas vākiem, šķīvjiem vai plēvi, lai novērstu substrāta izžūšanu, un tos 14 dienas tur testa apstākļos.

Novērtējums jāveic 14 dienas (un vajadzības gadījumā septiņas dienas) pēc testa sākuma. Substrātu izlīdzina uz stikla vai nerūsējošā tērauda plāksnes. Apskata sliekas un nosaka izdzīvojušo slieku skaitu. Slieku uzskata par nedzīvu, ja tā nereaģē uz vieglu mehānisku kairinājumu priekšgalā.

Ja mirstību pārbauda pēc septiņām dienām, tad pēc pārbaudes konteineru atkal piepilda ar to pašu testa substrātu un izdzīvojušās sliekas novieto uz šā substrāta virsmas.

1.6.4. *Testa organismi*

Testa organismi ir pieauguši *Eisenia foetida* īpatņi (skatīt piezīmi papildinājumā) (vismaz divus mēnešus veci, ar jostiņu), kuru svars ir no 300 līdz 600 mg. (Pavairošanas metodi skatīt papildinājumā.)

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE UN NOVĒRTĒŠANA

Testētās vielas koncentrācijas norāda kopā ar atsauci uz atbilstošajiem bojāgājušo slieku procentuālajiem daudzumiem.

Ja dati ir adekvāti, tad LC_{50} vērtību un ticamības robežas (p = 0,05) nosaka ar standartmetodēm (Ličfīlds un Vilkoksons, 1949, vai līdzvērtīga metode). LC_{50} vērtību izsaka miligramos pārbaudāmās vielas uz kilogramu testa substrāta (sausna).

Ja koncentrācijas līknes slīpums ir pārāk stāvs, lai varētu aprēķināt LC_{50} vērtību, pietiek ar šīs vērtības grafisku novērtējumu.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kuru attiecība ir 1,8, izraisa tikai 0 % un 100 % mirstību, tad pietiek ar šīm divām vērtībām, lai noteiktu diapazonu, kam atbilst LC_{50} vērtība.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— apgalvojums, ka tests ir veikts saskaņā ar iepriekšminētajiem kvalitātes kritērijiem,

— testa veids (iedarbības diapazona noteikšanas tests un/vai galīgais tests),

— precīzs testa apstākļu apraksts vai apgalvojums, ka tests ir veikts saskaņā ar attiecīgo metodi,

— jānorāda visas atkāpes, precīzs tā paņēmiena apraksts, kas izmantots, lai pārbaudāmo vielu iemaisītu testa pamatsubstrātā,

— informācija par testa organismiem (suga, vecums, vidējais svars un svara diapazons, turēšanas un pavairošanas apstākļi, piegādātājs),

▼B

— LC_{50} noteikšanas metode,

— testa rezultāti, kā arī visi izmantotie dati,

— novēroto simptomu vai testa organismu uzvedības izmaiņu apraksts,

— mirstība kontrolsubstrātā,

— LC_{50} vai augstākā testētā koncentrācija bez mirstības un zemākā testētā koncentrācija ar 100 % mirstību 14 dienas (un, ja vajadzīgs, septiņas dienas) pēc testa sākuma,

— koncentrācijas/ietekmes līkne,

— ar standartvielu iegūtie rezultāti, kas var būt saistīti ar konkrēto testu vai ar agrākiem kvalitātes kontroles pasākumiem.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 671.

(4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardised 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, Verfahrensvorschlag “Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Papildinājums

Slieku pavairošana un turēšana pirms testēšanas

Slieku pavairošanas nolūkā 30 līdz 50 pieaugušas sliekas ievieto pavairošanas kastē ar svaigu substrātu un pēc 14 dienām izņem no tās. Šos dzīvniekus var izmantot tālākai pavairošanai. No kokoniem izšķīlušās sliekas testēšanai izmanto, kad tās ir sasniegušas briedumu (saskaņā ar paredzētajiem apstākļiem – pēc diviem vai trim mēnešiem).

Turēšanas un pavairošanas apstākļi

Klimata kontroles kamera:	temperatūra 20 ± 2 °C, vēlams pastāvīgs apgaismojums (intensitāte no 400 līdz 800 luksiem).
Pavairošanas kastes:	piemēroti, sekli konteineri, kuru tilpums ir no 10 līdz 20 l.
Substrāts:	*Eisenia foetida* var pavairot dažādu dzīvnieku ekskrementos. Ieteicams par pavairošanas substrātu izmantot maisījumu, kurā 50 % tilpuma ir kūdra un 50 % – liellopu vai zirgu mēsli. pH vērtībai šajā substrātā jābūt apmēram 6 līdz 7 (to regulē ar kalcija karbonātu), un substrātam jābūt ar zemu jonu vadītspēju (mazāk nekā 6 mmhos vai 0,5 % sāls koncentrācijas). Substrātam jābūt mitram, bet ne pārāk slapjam. Bez iepriekš aprakstītās metodes var izmantot arī citus sekmīgi lietotus paņēmienus.

Piezīme: ir divas *Eisenia foetida* pasugas, kuras daži taksonomisti nodala kā atsevišķas sugas (Bušs, 1972). Morfoloģiski tās ir līdzīgas, bet vienai, *Eisenia foetida foetida*, raksturīgs šķērsenisks segmentu iesvītrojums, kamēr otrai, *Eisenia foetida andrei*, tāda nav, toties novērojams daudzveidīgs iesarkans krāsojums. Ja iespējams, jāizmanto *Eisenia foetida andrei*. Citas sugas var izmantot tad, ja ir pieejama vajadzīgā metodoloģija.

▼B

C.9. **BIODEGRADĀCIJA**

CĀNA-VELLENA TESTS

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šīs metodes mērķis ir statiskā testā izvērtēt ūdenī šķīstošu, negaistošu organisku vielu maksimālo iespējamo bioloģiskās noārdīšanās spēju apstākļos, kad tās pakļauj relatīvi augstā koncentrācijā esošu mikroorganismu iedarbībai.

Interpretējot rezultātus (skatīt 3.2. punktu), jāņem vērā tas, ka ir iespējama fizikāli ķīmiskā adsorbcija uz suspendētajām daļiņām.

Pētāmās vielas izmanto koncentrācijās, kas atbilst IOO vērtībām diapazonā no 50 līdz 400 mg/l vai ĶSP vērtībām diapazonā no 100 līdz 1 000 mg/l (IOO = izšķīdis organiskais ogleklis; ĶSP = ķīmiskais skābekļa patēriņš). Šīs koncentrācijas, lai arī relatīvi augstas, ir analītiski ticamas. Savienojumi ar toksiskām īpašībām var novilcināt vai kavēt noārdīšanās procesu.

Šajā metodē pārbaudāmās vielas maksimālās bioloģiskās noārdīšanās spējas novērtēšanai izmanto izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācijas vai ķīmiskā skābekļa patēriņa mērījumus.

Ja vienlaikus izmanto kādu īpašu analīzes metodi, ir iespējams novērtēt vielas pirmējo biodegradāciju (sākotnējās ķīmiskās struktūras izzušanu).

Šī metode piemērojama tikai tādām organiskām pārbaudāmām vielām, kurām testā izmantotajā koncentrācijā ir šādas īpašības:

— testa apstākļos tās ir ūdenī šķīstošas,

— testa apstākļos tām ir neliels tvaika spiediens,

— nav inhibējošas ietekmes uz baktērijām,

— testa sistēma tās adsorbē tikai ierobežotā apmērā,

— tās neizdalās no testa šķīduma putošanas dēļ.

Iegūto rezultātu interpretēšanā noder informācija par pārbaudāmā materiāla galveno sastāvdaļu relatīvo īpatsvaru, sevišķi tajos gadījumos, kad rezultāti ir skaitliski nelieli vai tuvi kritiskajai robežai.

Skaitliski nelielu rezultātu interpretēšanā un piemērotu testa koncentrāciju izvēlē vēlams izmantot informāciju par attiecīgās vielas toksicitāti mikroorganismiem.

▼B

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Testa beigās sasniegto noārdīšanās pakāpi sauc par "biodegradāciju Cāna-Vellena testā":

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kur:

DT = biodegradācija (%) laikā T,

CA = IOO (vai ĶSP) vērtības testa maisījumā, mērītas trīs stundas pēc testa sākuma (mg/l) (IOO izšķīdis organiskais ogleklis; ĶSP = ķīmiskais skābekļa patēriņš),

CT = IOO vai ĶSP vērtības testa maisījumā parauga ņemšanas laikā (mg/l),

CB = IOO vai ĶSP vērtība tukšajā analīzē parauga ņemšanas laikā (mg/l),

CBA = IOO vai ĶSP vērtība tukšajā analīzē, mērīta trīs stundas pēc testa sākuma (mg/l).

Noārdīšanās pakāpes vērtību noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim.

Noārdīšanās procentuālo apjomu izsaka ar IOO (vai ĶSP) procentuālo daudzumu, kas raksturo testētās vielas noārdīšanu.

Trīs stundas pēc testa sākuma izmērītās vērtības un aprēķinātās vai, vēlams, izmērītās sākotnējās vērtības starpība var sniegt noderīgu informāciju par testētās vielas noārdīšanu (skatīt 3.2. punktu "Rezultātu interpretēšana").

1.3. STANDARTVIELAS

Dažos gadījumos, kad notiek jaunu vielu izpēte, var būt lietderīgi izmantot standartvielas, tomēr ieteikt konkrētas standartvielas pagaidām nevar.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Aktīvās dūņas, barības minerālvielas un pārbaudāmo materiālu kā vienīgo oglekļa avotu ūdens šķīdumā visus kopā ievieto viena līdz četru litru tilpuma stikla traukā, kas aprīkots ar maisītāju un aeratoru. Maisījumu līdz 28 dienas ilgā laika posmā maisa un aerē 20–25 °C temperatūrā izkliedētā apgaismojumā vai tumšā telpā. Noārdīšanās procesu novēro, reizi dienā vai citā piemērotā un regulārā laika intervālā nosakot IOO (vai ĶSP) vērtības filtrētajā šķīdumā. Pēc katra laika intervāla izdalītā IOO (vai ĶSP) un trīs stundas pēc testa sākuma izmērītās vērtības attiecību izsaka kā biodegradācijas procentuālo apmēru un ar šo attiecību raksturo noārdīšanās pakāpi konkrētajā laika posmā. Rezultātu atliek diagrammā attiecībā pret laiku, tā iegūstot biodegradācijas līkni.

Ja izmanto kādu īpašu analīzes metodi, var mērīt biodegradācijas izraisītās izmaiņas sākotnējo molekulu koncentrācijā (pirmējā biodegradācija).

▼B

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Gredzena testā šā testa reproducējamība ir atzīta par apmierinošu.

Metodes jutību lielā mērā nosaka tukšās analīzes mainīgums un – mazākā mērā – izšķīdušā organiskā oglekļa un maisījumā esošā pārbaudāmā savienojuma koncentrācijas noteikšanas precizitāte.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

1.6.1.1. Reaģenti

Testa ūdens: dzeramais ūdens, kurā organiskā oglekļa saturs ir mazāks par 5 mg/l. Kalcija un magnija jonu kopējā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 2,7 mmol/l; pretējā gadījumā jāizmanto atbilstīgs atšķaidījums ar dejonizētu vai destilētu ūdeni.

Sērskābe, analītiskais reaģents (A. R.):	50 g/l
Nātrija hidroksīda šķīduma A. R.:	40 g/l

Barības minerālvielu šķīdums; izšķīdināt vienā litrā dejonizēta ūdens:

amonija hlorīds, NH_4Cl, A. R.:	38,5 g
nātrija dihidrogēnfosfāts, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A. R.:	33,4 g
kālija dihidrogēnfosfāts, KH_2PO_4, A. R.:	8,5 g
dikālija monohidrogēnfosfāts, K_2HPO_4, A. R.:	21,75 g

Maisījums izmantojams gan kā barības viela, gan kā bufersistēma.

1.6.1.2. Iekārta

Stikla trauki, kuru tilpums ir viens līdz četri litri (piemēram, cilindriski trauki).

Maisītājs ar stikla vai metāla maisītājierīci, kas uzmontēta uz piemērotas vārpstas (maisītājierīcei jārotē apmēram 5–10 cm virs trauka dibena). Tās vietā var izmantot magnētisku maisītājierīci ar 7–10 cm garu stienīti.

Stikla caurulīte, kuras iekšējais diametrs ir 2–4 mm un kura paredzēta gaisa pievadei. Caurulītes atverei jāatrodas aptuveni 1 cm virs trauka dibena.

Centrifūga (aptuveni 3 550 g).

pH mērierīce.

Izšķīdušā skābekļa mērierīce.

Papīra filtri.

▼B

Membrānfiltrācijas iekārta.

Membrānfiltri, poru izmērs 0,45 μn. Membrānfiltri ir derīgi tad, ja tie visos filtrēšanas etapos nodrošina oglekļa necaurlaidību un neabsorbē pārbaudāmo vielu.

Analītiskās iekārtas organiskā oglekļa satura un ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšanai.

1.6.1.3. Inokulāta sagatavošana

Aktīvās dūņas no bioloģiskajām attīrīšanas iekārtām mazgā, tās (atkārtoti) centrifugējot vai izgulsnējot testa ūdenī (skatīt iepriekš).

Aktīvajām dūņām jābūt atbilstošā stāvoklī. Šādas dūņas ir pieejamas pienācīgi strādājošās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Lai iegūtu pēc iespējas vairāk dažādu baktēriju sugu vai celmu, var pagatavot inokulātu maisījumu no dažādiem avotiem (piemēram, dažādas attīrīšanas iekārtas, augsnes ekstrakti, upes ūdeņi u. c.). Šis maisījums jāapstrādā, kā aprakstīts iepriekš.

Informācijai par aktīvo dūņu aktivitātes testu skatīt punktu "Funkcionalitātes kontrole" turpmāk.

1.6.1.4. Testa šķīdumu pagatavošana

Testa traukā ievieto 500 ml testa ūdens, 2,5 ml/l barības minerālvielu šķīduma un aktīvās dūņas tādā daudzumā, kas atbilst no 0,2 līdz 1,0 g/l sausnas galīgajā maisījumā. Pievieno pietiekamu daudzumu pārbaudāmās vielas standartšķīduma, lai galīgajā maisījumā IOO koncentrācija būtu no 50 līdz 400 mg/l. Atbilstošā ĶSP vērtība ir no 100 līdz 1 000 mg/l. Maisījumu uzpilda ar testa ūdeni tā, lai kopējais tilpums būtu no viena līdz četriem litriem. Kopējais tilpums, kas jāizvēlas, ir atkarīgs no to paraugu skaita, kurus paredzēts ņemt, lai noteiktu IOO vai ĶSP, un no tilpumiem, kas vajadzīgi analītiskās procedūras mērķiem.

Parasti pietiek ar divu litru tilpumu. Katrā testa sērijā līdz ar citiem uzstāda vismaz vienu kontroltrauku (tukšā analīze); tajā ir tikai aktīvās dūņas un barības minerālvielu šķīdums, kas uzpildīts ar testa ūdeni līdz tādam pašam kopējam tilpumam, kāds ir testa traukos.

1.6.2. *Testa veikšana*

Testa trauku saturu 20–25 °C temperatūrā un izkliedētā apgaismojumā vai tumšā telpā maisa ar magnētiskām maisītājierīcēm vai ar dzenskrūvēm. Aerāciju veic ar saspiestu gaisu, ko attīra ar kokvilnas filtru un vajadzības gadījumā ar skalotni. Jānodrošina, lai dūņas neizgulsnējas un lai skābekļa koncentrācija nenoslīd zem 2 mg/l.

Regulāri (piemēram, katru dienu) jāpārbauda pH vērtība un vajadzības gadījumā tā jākoriģē, lai pH vērtība būtu 7–8.

▼B

Iztvaikošanas radītos zudumus kompensē, tieši pirms katras paraugu ņemšanas pievienojot nepieciešamo daudzumu dejonizēta vai destilēta ūdens. Laba prakse ir pirms testa sākuma uz trauka atzīmēt šķidruma līmeni. Pēc katras paraugu ņemšanas reizes (bez aerācijas un maisīšanas) izdara jaunas atzīmes. Pirmos paraugus vienmēr ņem trīs stundas pēc testa sākuma, lai šādi noteiktu aktīvo dūņu adsorbētā pārbaudāmā materiāla daudzumu.

Pārbaudāmā materiāla noārdīšanu novēro, katru dienu vai kādā citā regulārā intervālā veicot IOO vai ĶSP noteikšanu. No testa trauka un tukšās analīzes ņemtos paraugus filtrē caur rūpīgi mazgātu papīra filtru. Pirmos 5 ml testa šķīduma filtrāta izlej. Grūti filtrējamas dūņas var iepriekš atdalīt, paraugu 10 minūtes centrifugējot. IOO un ĶSP ikreiz nosaka vismaz divos atkārtojumos. Maksimālais testa ilgums ir 28 dienas.

Piezīme: duļķainos paraugus filtrē caur membrānfiltriem. Membrānfiltri nedrīkst laist cauri vai adsorbēt nekādu organisku materiālu.

Aktīvo dūņu funkcionalitātes kontrole

Katrā testa sērijā līdz ar citiem jāuzstāda arī trauks, kurā atrodas zināma viela, lai šādi pārbaudītu aktīvo dūņu darbspēju. Šim nolūkam labi der dietilēnglikols.

Pielāgošana

Ja analīzes veic ar relatīvi īsām laika atstarpēm (piemēram, katru dienu), tad noārdīšanās līknē (skatīt 2. attēlu) pielāgojumi ir skaidri redzami. Tādēļ testu nevajadzētu sākt tieši pirms iknedēļas brīvdienām.

Ja pielāgošana notiek testa beigās, tad testu var paildzināt, kamēr noārdīšanās beidzas.

Piezīme: ja vajadzīgas sīkākas ziņas par pielāgoto dūņu dzīvības procesiem, tad tās pašas aktīvās dūņas vēlreiz ievieto tajā pašā pārbaudāmā materiālā saskaņā ar šādu procedūru.

Izslēdz maisītāju un aeratoru un ļauj aktīvajām dūņām nogulsnēties. Nosmeļ šķidruma virsslāni, uzpilda to ar testa ūdeni līdz divu litru tilpumam, maisa 15 minūtes un atkal ļauj nogulsnēties. Vēlreiz nosmeļ šķidruma virsslāni un, izmantojot atlikušās dūņas, atkārto testu ar to pašu materiālu, kā aprakstīts iepriekš 1.6.1.4. un 1.6.2. punktā. Aktīvās dūņas var atdalīt arī centrifugējot, nevis izgulsnējot.

Pielāgotās dūņas var samaisīt ar svaigām dūņām, lai koncentrācija būtu 0,2–1 g sausnas uz litru.

▼B

Analītiskie līdzekļi

Parasti paraugus filtrē caur rūpīgi mazgātu papīra filtru (mazgāšanai izmanto dejonizētu ūdeni).

Duļķainos paraugus filtrē caur membrānfiltriem (0,45 μm).

Izmantojot kopējā organiskā oglekļa (TOC) rādītāju, divos atkārtojumos nosaka IOO koncentrāciju paraugu filtrātos (pirmos 5 ml izlej). Ja filtrātu nav iespējams analizēt tajā pašā dienā, tad līdz nākamajai dienai tas jāuzglabā ledusskapī. Ilgāka uzglabāšana nav ieteicama.

ĶSP koncentrāciju nosaka paraugu filtrātos ar ĶSP analītisko gatavību un saskaņā ar izmantotās literatūras sarakstā (2) aprakstīto metodi.

2. **DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA**

IOO un/vai ĶSP koncentrācijas paraugos nosaka vismaz divos atkārtojumos, kā aprakstīts iepriekš 1.6.2. punktā. Noārdīšanos laikā T aprēķina pēc formulas (pie definīcijām), kā norādīts iepriekš 1.2. punktā.

Noārdīšanās pakāpes vērtību noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim. Testa beigās sasniegto noārdīšanās pakāpi sauc par "biodegradāciju Cāna-Vellena testā".

Piezīme: ja pilnīga noārdīšanās notikusi pirms testam atvēlētā laika beigām un ja šo rezultātu apstiprina nākamajā dienā veikta otra analīze, tad testu var beigt.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— vielas sākotnējā koncentrācija,

— visa pārējā informācija un eksperimentālie rezultāti, kas attiecas uz testēto vielu, standartvielu, ja tāda ir izmantota, un tukšo analīzi,

— vielas koncentrācija pēc trim stundām,

— biodegradācijas līkne un tās apraksts,

— testa organismu ievākšanas datums un vieta, pielāgotības statuss, izmantotā koncentrācija u. c.,

— zinātnisks pamatojums visām testa metodes izmaiņām.

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

IOO (ĶSP) samazināšanās, kas notiek pakāpeniski vairāku dienu vai nedēļu laikā, norāda uz to, ka pārbaudāmā viela tiek bioloģiski noārdīta.

▼B

Tomēr dažos gadījumos var izpausties fizikālķīmiskā adsorbcija, un uz to norāda pilnīga vai daļēja vielas izzušana jau no paša sākuma, pirmo trīs stundu laikā, kā arī tas, ka kontrolmaisījuma un testa maisījuma virsslāņu kvalitatīvā atšķirība saglabājas negaidīti maza.

Lai nodalītu biodegradāciju (vai daļēju biodegradāciju) no adsorbcijas, jāveic turpmāki testi.

To var veikt vairākos veidos, bet vispārliecinošākais ir izmantot šķīduma virsslāni vai dūņas par inokulātu galvenajā sarakstā iekļautā testā (vēlams – respirometriskā testā).

Pārbaudāmās vielas, kam šajā testā raksturīga stipra neadsorbējoša IOO (ĶSP) samazināšanās, uzskatāmas par potenciāli bioloģiski noārdāmām. Daļēja neadsorbējoša samazināšanās norāda uz to, ka ķīmiskā viela vismaz daļēji ir bioloģiski noārdāma. Vāju IOO (ĶSP) samazināšanos vai tās trūkumu var būt izraisījusi pārbaudāmās vielas inhibējošā iedarbība uz mikroorganismiem, uz ko norāda arī līze un dūņu zudums, kā rezultātā šķīduma virsslānis ir duļķains. Tests jāatkārto ar zemāku pārbaudāmās vielas koncentrāciju.

Lielāku jutību iespējams sasniegt, izmantojot savienojumam specifisku analīzes metodi vai ar radioaktīvo oglekli ^{14}C marķētu pārbaudāmo vielu. Ar ^{14}C marķēta pārbaudāmā savienojuma gadījumā to, ka ir notikusi biodegradācija, apstiprina $^{14}CO_2$ atgūšana.

Ja rezultāti raksturo pirmējo biodegradāciju, tad iespēju robežās jāizskaidro ķīmiskās struktūras izmaiņas, kas izraisa reakcijas zudumu sākotnējā pārbaudāmā vielā.

Analīzes metodes validācija jāsniedz kopā ar tukšajā analīzē iegūto rezultātu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Pielikums V C.9 “Sadalīšanās – ķīmiskais skābekļa patēriņš”, Komisijas Direktīva 84/449/EEK (OV L 251, 19.9.1984., 1. lpp.).

▼B

Papildinājums

NOVĒRTĒJUMA PIEMĒRS

Organiskais savienojums:	4-etoksibenzoskābe
Teorētiskā testa koncentrācija	600 mg/l
Teorētiskais IOO	390 mg/l
Inokulāts:	... notekūdeņu attīrīšanas iekārtas
Koncentrācija:	1 grams sausnas uz litru
Pielāgotības statuss	nav pielāgots
Analīze:	IOO noteikšana
Parauga apjoms:	3 ml
Kontrolviela:	dietilēnglikols
Savienojuma toksicitāte:	koncentrācijā zem 1 000 mg/l toksiskas iedarbības nav Izmantotais tests: fermentācijas tests ar stobriņu metodi

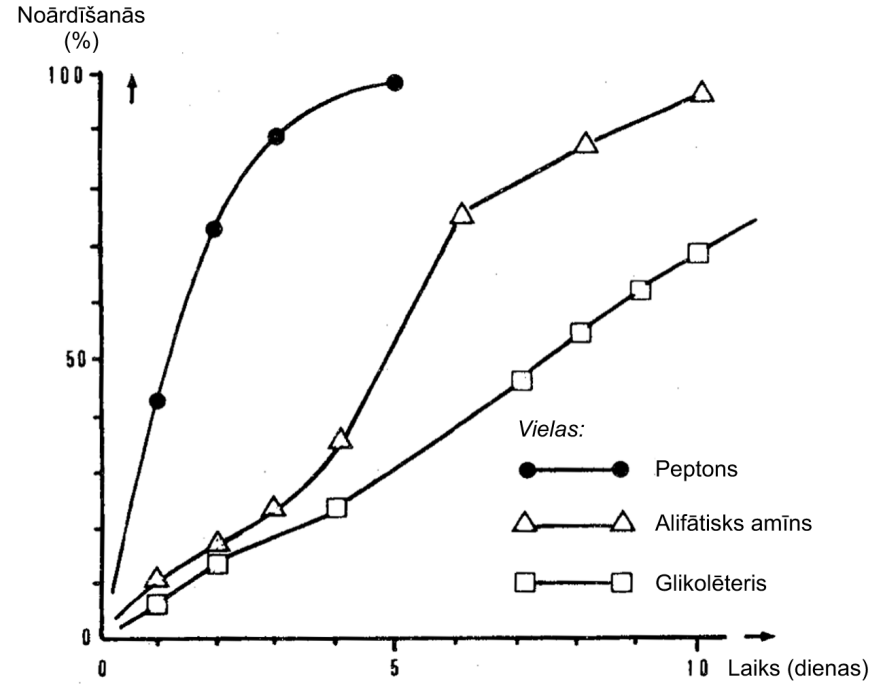
Testa laiks	Kontrolviela				Pārbaudāmā viela		
	Tukšā analīze, IOO ([1]), mg/l	IOO ([1]), mg/l	IOO, tīrais, mg/l	Noārdīšanās %	IOO ([1]), mg/l	IOO, tīrais, mg/l	Noārdīšanās %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 stundas	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 diena	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dienas	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dienas	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dienas	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dienas	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dienas	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dienas	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dienas	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Trīskāršu atkārtojumu vidējās vērtības.

▼B

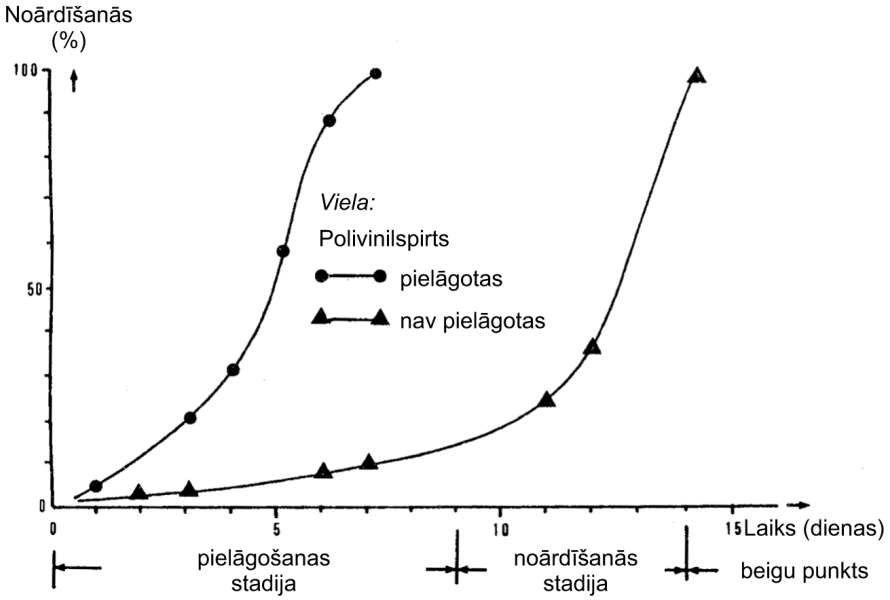
1. attēls

Biodegradācijas līkņu piemēri



2. attēls

Dūņu pielāgošanas piemēri



▼M4

C.10. **AEROBĀS NOTEKŪDEŅU ATTĪRĪŠANAS IMITĀCIJAS TESTS. C.10.-A. AKTĪVO DŪŅU BLOKI – C.10.-B. BIOPLĒVES**

C.10.-A. Aktīvo dūņu bloki

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – *TG*) 303 (2001. gads). Divdesmitā gadsimta 50. gados tika secināts, ka jaunās virsmaktīvās vielas rada pārmērīgu ūdens putošanos notekūdeņu attīrīšanas iekārtās un upēs. Aerobajā attīrīšanā šīs virsmaktīvās vielas netika pilnībā noārdītas, un dažos gadījumos tās ierobežoja citu organisko vielu noārdīšanos. Šajā saistībā tika uzsākti daudzi pētījumi par to, kā notekūdeņos varētu noārdīt virsmaktīvās vielas un vai ar notekūdeņu attīrīšanu ir iespējams noārdīt nozarē izstrādātās jaunās ķīmiskās vielas. Lai to paveiktu, tika izmantoti bloku modeļi, kuru darbība atspoguļo divu galveno aerobās bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas veidu darbību (aktīvās dūņas un filtrēšana ar perkolēšanu vai pilināšanu). Katras jaunās ķīmiskās vielas izplatīšana un liela apjoma attīrīšanas iekārtu uzraudzība būtu bijusi nepraktiska un saistīta ar ļoti augstām izmaksām, pat ja tiktu īstenota vietējā līmenī.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Aktīvo dūņu bloki

2. Aprakstītie aktīvo dūņu bloku modeļi ir tilpumā no 300 ml līdz aptuveni 2 000 ml. Daži no modeļiem bija tuvas imitācijas pilna izmēra iekārtām, kam ir dūņu nosēdtvertnes, no kurām nogulsnējušās dūņas iesūknē atpakaļ aerācijas tvertnē, savukārt citiem modeļiem nosēdtvertņu nebija, piemēram, *Swisher* (1). Iekārtas tilpumam jābūt piemērotam, proti, no vienas puses, tam jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama sekmīga mehāniskā darbība un pietiekama daudzuma paraugu nodrošināšana, neietekmējot darbību, savukārt, no otras puses, tas nedrīkstētu būt tik liels, ka tam vajadzīga pārmēru liela telpa un pārāk daudz materiālu.

3. Plaši un ar apmierinošiem rezultātiem tiek izmantoti šādi divi iekārtu veidi: *Husmann* bloki (2) un porainā tīģeļa bloki (3) (4), no kuriem pirmo izmanto virsmaktīvo vielu izpētē; abu bloku darbība aprakstīta šajā testēšanas metodē. Tāpat ar apmierinošiem rezultātiem tiek izmantoti citi modeļi, piemēram, *Eckenfelder* (5). Šā imitācijas testa samērā augsto izmaksu un sarežģītības dēļ paralēli tika izskatīti vienkāršāki un lētāki skrīninga testi, kas ir ietverti šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļā (6). Pieredze ar daudzām virsmaktīvajām vielām un ķīmiskajām vielām ir parādījusi, ka vielas, kas sekmīgi noārdījās skrīninga testos (viegli bionoārdāmas), noārdījās arī imitācijas testā. Dažas no vielām, kas nenoārdījās skrīninga testos, noārdījās potenciālās bionoārdīšanās testos (šā pielikuma C.12. nodaļa (7) un C.19. nodaļa (8)), taču tikai neliels skaits no minētās grupas vielām noārdījās imitācijas testā, savukārt ķīmiskās vielas, kuras nenoārdījās potenciālās bionoārdīšanās testos, nenoārdījās arī imitācijas testos (9) (10) (11).

4. Dažiem nolūkiem pietiek ar imitācijas testiem, kas veikti vienveidīgos darbības apstākļos, un rezultātus izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas vai izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – *DOC*) noārdīšanās īpatsvaru. Šajā testēšanas metodē ir ietverts šāda testa apraksts. Tomēr pretēji šīs nodaļas iepriekšējai redakcijai, kurā bija aprakstīts tikai viens iekārtas veids, kas

▼M4

attīra sintētiskos notekūdeņus savienoto bloku režīmā, izmantojot samērā neprecīzu dūņu zuduma metodi, šajā tekstā ir piedāvātas vairākas variācijas. Ir aprakstītas iekārtas veida, darbības veida, notekūdeņu un dūņu zuduma noārdīšanas alternatīvas. Šis teksts ir ļoti līdzīgs ISO 11733 (12), ko sagatavošanas laikā rūpīgi pārskatīja, lai gan metodei nav piemērots starplaboratoriju salīdzinošais tests.

5. Citiem nolūkiem testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai attīrītajā notekūdenī ir jābūt zināmai precīzāk, un tam ir vajadzīga plašāka metode. Piemēram, dūņu zudums ir jākontrolē precīzāk katru dienu un visā testēšanas laikā, un bloki ir jādarbina ar vairākiem dūņu zuduma režīmiem. Lai metode būtu pilnībā vispusīga, testēšana jāveic arī ar divām vai trijām atšķirīgām temperatūrām. Šādu metodi ir aprakstījis *Birch* (13) (14), un tā ir rezumēta 6. papildinājumā. Tomēr pašreizējās zināšanas nav pietiekamas, lai pieņemtu lēmumu par to, kurš no kinētikas modeļiem ir piemērojams ķīmisko vielu bionoārdīšanai notekūdeņu attīrīšanā un ūdens vidē vispār. *Monod* kinētikas piemērošana, kas sniegta kā piemērs 6. papildinājumā, ir attiecināma tikai uz ķīmiskajām vielām, kuru klātbūtne ir 1 mg/l vai vairāk, bet, pēc dažu iesaistīto personu domām, pat tas vēl ir jāpamato. Testi ar koncentrācijām, kas patiesāk atspoguļo koncentrācijas notekūdeņos, ir norādīti 7. papildinājumā, savukārt tādi testi kā 6. papildinājumā aprakstītais ir ietverti papildinājumos, nevis atsevišķā testēšanas metodē.

Filtri

6. Daudz mazāk uzmanības ir pievērsts perkolēšanas filtru modeļiem. Iespējams tādēļ, ka tie ir sarežģītāki un nav tik kompakti kā aktīvo dūņu iekārtu modeļi. *Gerike et al.* izstrādāja pilināšanas filtra blokus un darbināja tos savienoto bloku režīmā (15). Šie filtri bija samēra lieli (augstums: 2 m; tilpums: 60 l), un katram bija vajadzīgi notekūdeņi 2 l/h apmērā. *Baumann et al.* (16) imitēja pilināšanas filtrus, ievietojot poliestera "šķiedras" sloksnes 1 m caurulēs (iekšējais diametrs: 14 mm) pēc tam, kad šīs sloksnes bija 30 minūtes noturētas koncentrētās aktīvajās dūņās. Vertikālā caurulē ievadīja testējamo ķīmisko vielu kā vienīgo oglekļa avotu minerālsāļu šķīdumā un bionoārdīšanos novērtēja ar *DOC* mērījumiem attīrītajā notekūdenī un CO_2 mērījumiem emitētajā gāzē.

7. Biofiltrus imitēja citādi (15). Rotējošās, nelielā leņķī slīpi attiecībā pret horizontāli novietotās caurulēs iepildīja notekūdeņus (apm. 250 ml/h) ar testējamo ķīmisko vielu un bez tās un savāktos attīrītos notekūdeņus analizēja, lai noteiktu *DOC* un/vai konkrēto testējamo ķīmisko vielu.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

8. Šī metode ir izstrādāta, lai ar to noteiktu ūdenī šķīstošu organisko ķīmisko vielu noārdīšanos un primāro un/vai galīgo bionoārdīšanos ar aerobajiem mikroorganismiem nepārtraukti darbinātā testēšanas sistēmā, kas imitē aktīvo dūņu procesu. Viegli bionoārdāma organiskā barotne un organiskās testējamās ķīmiskās vielas ir mikroorganismu oglekļa un enerģijas avots.

9. Paralēli identiskos apstākļos, ko izvēlas atbilstīgi testēšanas mērķim, tiek darbināti divi nepārtraukti strādājoši testēšanas bloki (aktīvo dūņu vai porainā tīģeļa). Parasti vidējais hidrauliskās aiztures laiks ir 6 h un vidējais dūņu vecums (dūņu aiztures laiks) ir 6–10 dienas. Dūņu zudumu nodrošina ar vienu no divām metodēm, proti, testējamo ķīmisko vielu parasti *DOC* koncentrācijā no 10 līdz 20 mg/l pievieno tikai viena bloka ieplūdei (organiskā barotne). Otru bloku izmanto kā kontroles bloku, lai noteiktu organiskās barotnes bionoārdīšanos.

▼M4

10. Regulāri ņemtos attīrīto notekūdeņu paraugos, veicot konkrētu analīzi, nosaka *DOC*, kas ir vēlamāk, vai ķīmisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *COD*) kopā ar testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (ja vajadzīgs) attīrītajā notekūdenī no bloka, kurš saņem testējamo ķīmisko vielu. Pieņem, ka starpība starp *DOC* vai *COD* koncentrācijām attīrītajā notekūdenī testēšanas blokā un kontroles blokā ir attiecināma uz testējamo ķīmisko vielu vai tās organiskajiem metabolītiem. Šo starpību salīdzina ar *DOC* vai *COD* koncentrācijām ieplūdē pievienotās testējamās ķīmiskās vielas dēļ, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanos.

11. Bionoārdīšanos parasti var nošķirt no bioadsorbcijas, rūpīgi izpētot noārdīšanās un laika līkni, un to parasti var apstiprināt, īstenojot vieglās bionoārdīšanās testu ar aklimatizētu sējmateriālu no bloka, kas saņem testējamo ķīmisko vielu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

12. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas tīrībai, šķīdībai ūdenī, gaistamībai un adsorbcijas īpašībām, lai būtu iespējams pareizi interpretēt iegūstamos rezultātus. Parasti gaistošas un nešķīstošas ķīmiskās vielas nevar testēt, ja vien netiek īstenoti īpaši piesardzības pasākumi (sk. 5. papildinājumu). Jābūt zināmai arī ķīmiskajai struktūrai vai vismaz empīriskajai formulai, lai būtu iespējams aprēķināt teorētiskās vērtības un/vai pārbaudīt parametru noteiktās vērtības, piemēram, teorētisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *ThOD*), *DOC* un *COD*.

13. Piemērotāko testēšanas koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksisko iedarbību uz mikroorganismiem (sk. 4. papildinājumu), un tā var būt svarīga bionoārdīšanās spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

14. Pirms virsmaktīvo vielu var laist tirgū, ar šā imitācijas (apstiprināšanas) testa sākotnēju piemērošanu virsmaktīvo vielu primārajai bionoārdīšanai ir jānoārda vairāk nekā 80 % no konkrētās ķīmiskās vielas. Ja netiek sasniegts 80 % līmenis, šo imitācijas (apstiprināšanas) testu var piemērot un virsmaktīvo vielu var laist tirgū tikai tad, ja vairāk nekā 90 % no konkrētās ķīmiskās vielas ir noārdīti. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām parasti nav šaubu par sekmīgu vai nesekmīgu testēšanas rezultātu, un iegūto noārdīšanas īpatsvara vērtību var izmanot, lai aptuveni aprēķinātu iespējamo koncentrāciju vidē, ko var izmantot ķīmisko vielu radītā apdraudējuma novērtēšanā. Rezultāti parasti ir nešaubīgi. Vairākos pētījumos ar tīrām ķīmiskām vielām atklātais *DOC* noārdīšanās īpatsvars bija > 90 % vairāk nekā trīs ceturtdaļās gadījumu un > 80 % no vairāk nekā 90 % ķīmisko vielu, kas uzrādīja jebkādu būtisku bionoārdīšanās pakāpi.

15. Samērā mazs skaits ķīmisko vielu (piemēram, virsmaktīvo vielu) notekūdenī sasniedz koncentrācijas, ko izmanto šajā testā (apm. 10 mg C/l). Dažas ķīmiskās vielas šādās koncentrācijās var būt inhibējošas, savukārt citu noārdīšanās kinētika var atšķirties pie zemām koncentrācijām. Noārdīšanos var novērtēt precīzāk, izmantojot pielāgotas metodes, kurās izmanto reālistiski zemas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas, un apkopotos datus varētu izmantot kinētikas konstanšu aprēķināšanā. Tomēr vajadzīgie testēšanas paņēmieni vēl nav pilnībā validēti, turklāt vēl nav noteikti kinētikas modeļi, kas apraksta bionoārdīšanās reakcijas (sk. 7. papildinājumu).

▼M4

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

16. Lai nodrošinātu eksperimenta procedūras pareizu īstenošanu, dažreiz vienlaikus kopā ar testējamo ķīmisko vielu izpēti ir lietderīgi testēt testējamās ķīmiskās vielas, kuras ir zināmas. Šādas ķīmiskās vielas ietver adipīnskābi, 2-fenilfenolu, 1-naftolu, difēnskābi, 1-naftālskābi utt. (9) (10) (11).

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

17. Par imitācijas testiem ir pieejams mazāks skaits pētījumu pārskatu nekā par vieglās bionoārdīšanās testiem. Starp (vienlaicīgiem) replicējumiem pastāv laba atkārtojamība (10–15 %) attiecībā uz testējamām ķīmiskām vielām, kas noārdījušās 80 % vai vairāk apmērā, savukārt attiecībā uz ķīmiskām vielām, kuras noārdījušās sliktāk, pastāv lielāka mainība. Turklāt attiecībā uz dažām robežām tuvām ķīmiskajām vielām ir reģistrēti ļoti atšķirīgi rezultāti (piemēram, 10 %, 90 %) dažādos posmos testēšanas deviņu nedēļu laikā.

18. Starp rezultātiem, ko iegūst ar minētajiem diviem iekārtu veidiem, nav konstatētas lielas atšķirības, bet dažas ķīmiskās vielas ir uzrādījušas plašāku un konsekventāku noārdīšanos sadzīves notekūdeņos nekā ESAO sintētiskajos notekūdeņos.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Iekārta

Testēšanas sistēma

19. Vienas testējamās ķīmiskās vielas testēšanas sistēmu veido testēšanas bloks un kontroles bloks, taču, ja īsteno tikai konkrētas analīzes (primārā bionoārdīšanās), ir vajadzīgs tikai testēšanas bloks. Vienu kontroles bloku var izmantot vairākiem testēšanas blokiem vai nu ar tām pašām, vai citām testējamām ķīmiskām vielām. Savienoto bloku gadījumā (3. papildinājums) katram testēšanas blokam jābūt savam kontroles blokam. Testēšanas sistēma var būt vai nu aktīvo dūņu iekārtas modelis, *Husmann* bloks (1. papildinājuma 1. attēls), vai porainais tīģelis (1. papildinājuma 2. attēls). Abos gadījumos ir vajadzīgi pietiekami lieli glabāšanas trauki ieplūdēm un attīrītajiem notekūdeņiem, kā arī sūkņi ieplūdes dozēšanai vai nu kopā ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu, vai atsevišķi.

20. Katrs aktīvo dūņu iekārtas bloks sastāv no aerācijas trauka ar zināmu kapacitāti aptuveni 3 litru aktīvo dūņu apmērā un nostādināšanas trauka (sekundārais attīrītājs), kura tilpums ir aptuveni 1,5 litri. Tilpumus var nedaudz izmainīt, koriģējot nostādināšanas trauka augstumu. Ir pieļaujami dažāda izmēra trauki, ja tos darbina ar salīdzināmu hidraulisko noslodzi. Ja testēšanas telpā nav iespējams uzturēt temperatūru vēlamajā diapazonā, ir ieteicams izmantot traukus ar ūdens apvalku, kas nodrošina iespēju kontrolēt šā ūdens temperatūru. Lai atkārtoti apstrādātu aktīvās dūņas no nostādināšanas trauka aerācijas traukā, izmanto saspiesta gaisa sūkni vai dozētājsūkni vai nu nepārtraukti, vai periodiski vienādos intervālos.

21. Porainā tīģeļa sistēmu veido iekšējais, porainais cilindrs ar konusveida apakšu, kas ievietots nedaudz lielākā tādas pašas formas traukā, kurš izgatavots no necaurlaidīgas plastmasas. Poraino trauku var izgatavot no poraina polietilēna ar maksimālo poru izmēru 90 μm apmērā un biezumu 2 mm apmērā. Dūņu nodalīšanu no attīrītās organiskās barotnes nodrošina atšķirīga caurtece cauri porainajai sienai. Attīrītie notekūdeņi tiek savākti gredzenveidīgā telpā, no kuras tie pārplūst uz savākšanas trauku. Nenotiek nogulsnēšanās, tādēļ dūņas neatgriežas. Visu sistēmu var uzstādīt termostatējamā

▼M4

ūdens vannā. Porainie tīģeļi aizsprostojas, un sākotnējos posmos var notikt pārplūde. Tādā gadījumā ir jāaizvieto porainais ieliktnis ar tīru ieliktni, vispirms sifonējot dūņas no tīģeļa uz tīru spaini un izņemot aizsprostoto ieliktni. Pēc necaurlaidīgā ārējā cilindra izslaucīšanas jāieliek tīrs ieliktnis un dūņas jāievieto atpakaļ tīģelī. Uzmanīgi tiek nokasītas un ievietotas atpakaļ dūņas arī no aizsprostotā ieliktņa. Aizsprostotie tīģeļi ir jātīra, vispirms izmantojot mērenu ūdens strūklu, lai nomazgātu pārējās dūņas, un pēc tam mērcējot tos atšķaidītā nātrija hipohlorīta šķīdumā, pēc tam ūdenī, un pēc tam rūpīgi noskalojot ar ūdeni.

22. Dūņu aerācijai abu sistēmu aerācijas traukos ir vajadzīgi piemēroti paņēmieni, piemēram, poraina stikla kubi (difuzorie akmeņi) un saspiests gaiss. Gaisu attīra, ja vajadzīgs, laižot to cauri filtram un mazgājot. Sistēmai cauri ir jāizplūst pietiekami daudz gaisam, lai uzturētu aerobos apstākļus un visā testēšanas laikā suspendētu dūņu kopas.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

23. Iekārta paraugu filtrēšanai ar membrānas filtriem, kam ir pietiekama porainība (nominālais atvērumu diametrs ir 0,45 μm) un kas adsorbē šķīstošas organiskās ķīmiskās vielas un nelielā mērā palaiž cauri organisko oglekli. Ja tiek izmantoti filtri, kas organisko oglekli neaiztur vispār, tie ir rūpīgi jānomazgā ar karstu ūdeni, lai nomazgātu noskalojamo organisko oglekli. Var izmantot arī centrifūgu, kas spēj nodrošināt 40 000 m/s^2.

Analītiskais aprīkojums

24. Iekārta, kas vajadzīga, lai noteiktu:

— *DOC* un kopējo organisko oglekli (turpmāk – *TOC*) vai *COD*,

— konkrētu ķīmisko vielu, ja vajadzīgs,

— suspendētās cietās daļiņas, pH, skābekļa koncentrāciju ūdenī,

— temperatūru, skābumu un sārmainību,

— amoniju, nitrītu un nitrātu, ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos.

Ūdens

25. Krāna ūdens, kurā *DOC* nepārsniedz 3 mg/l. Jānosaka sārmainība, ja nav jau zināma.

26. Dejonizēts ūdens, kurā *DOC* nepārsniedz 2 mg/l.

Organiskā barotne

27. Kā organiskā barotne ir pieļaujams sintētiskais notekūdens, sadzīves notekūdens vai abu maisījums. Ir pierādīts (11) (14), ka vienīgi sadzīves notekūdens izmantošana nereti uzrāda lielāku *DOC* noārdīšanās īpatsvaru un pat pieļauj dažu tādu ķīmisko vielu noārdīšanos un bionoārdīšanos, kuras bioloģiski nenoārdās, izmantojot ESAO sintētisko notekūdeni. Turklāt sadzīves notekūdens nepārtraukta vai periodiska pievienošana nereti stabilizē aktīvās dūņas, arī to svarīgo spēju labi nogulsnēties. Tādējādi ir ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni. *DOC* vai *COD* koncentrācija ir jānosaka katrā jaunā organiskās barotnes partijā. Organiskās barotnes skābumam un sārmainībai ir jābūt zināmai. Organiskajai barotnei var būt nepieciešams pievienot piemērotu buferšķīdumu (nātrija hidrogēnkarbonātu vai kālija dihidrogēnfosfātu), ja tai ir zems skābums vai sārmainība, lai testēšanas laikā aerācijas traukā pH uzturētu aptuveni 7,5 ± 0,5 apmērā. Lēmums par pievienojamā buferšķīduma tilpumu un pievienošanas laiku jāpieņem katrā gadījumā atsevišķi. Ja nepārtraukti vai periodiski tiek izmantoti maisījumi, maisījuma *DOC* (vai *COD*) jāuztur aptuveni nemainīgā vērtībā, piemēram, atšķaidot ar ūdeni.

▼M4

Sintētiskais notekūdens

28. Jāšķīdina litrā krāna ūdens: 160 mg peptona, 110 mg gaļas ekstrakta, 30 mg urīnvielas, 28 mg bezūdens dikālija hidrogēnfosfāta (K_2HPO_4), 7 mg nātrija hlorīda (NaCl), 4 mg kalcija hlorīda dihidrāta ($CaCl_2.2H_2O$) un 2 mg magnija sulfāta heptahidrāta ($Mg_2SO_4.7H_20$). Šis ESAO sintētiskais notekūdens ir piemērs un paredz vidējo *DOC* koncentrāciju ieplūdē aptuveni 100 mg/l apmērā. Var izmantot arī citus savienojumus ar apmēram tādu pašu *DOC* koncentrāciju, kas tuvāk atspoguļo faktisko notekūdeni. Ja ir vajadzīga ieplūde ar mazāku koncentrāciju, sintētiskais notekūdens ir jāatšķaida, piemēram, 1:1, ar krāna ūdeni, lai iegūtu koncentrāciju aptuveni 50 mg/l apmērā. Šāda mazāk koncentrēta ieplūde ļaus labāk veidoties nitrificējošiem organismiem, un šādas izmaiņas ir jāpiemēro gadījumā, ja tiek pētīta nitrificējošu notekūdeņu attīrīšanas iekārtu imitācija. Šo sintētisko notekūdeni var izstrādāt destilētā ūdenī koncentrētā veidā un glabāt aptuveni 1 °C temperatūrā līdz pat vienai nedēļai. Kad vajadzīgs, jāatšķaida ar krāna ūdeni. (Šī barotne ir neapmierinoša, jo to raksturo, piemēram, ļoti augsta slāpekļa koncentrācija, samērā zems oglekļa saturs, bet nekas labāks nav atklāts, izņemot ieteikumu pievienot vairāk fosfātu kā buferšķīdumu un papildu peptonu.)

Sadzīves notekūdens

29. Jāizmanto svaigs, nogulsnējies notekūdens, kas iegūts ikdienas attīrīšanas darbos, kuros galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni. Tas jāsavāc pirms nogulsnēšanās no primārās pārplūdes kanāla nosēdtvertnes vai no barotnes aktīvo dūņu iekārtai, un tam lielākoties jābūt bez rupjām daļiņām. Notekūdeni var izmantot pēc vairāku dienu glabāšanas (bet parasti tai nevajadzētu pārsniegt septiņas dienas) aptuveni 4 °C, ja tiek nodrošināts, ka glabāšanas laikā būtiski nesamazinās *DOC* (vai *COD*) (t. i., mazāk kā par 20 %). Lai ierobežotu sistēmas traucējumus, pirms izmantošanas katras jaunas partijas *DOC* (vai *COD*) ir jāpielāgo atbilstīgai nemainīgai vērtībai, piemēram, atšķaidot ar krāna ūdeni.

Aktīvās dūņas

30. Aktīvās dūņas sējmateriālam ir jāsavāc no atbilstīgi funkcionējošas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas aerācijas tvertnes vai no laboratorijas aktīvo dūņu bloka, kas galvenokārt attīra sadzīves notekūdeni.

Testējamo ķīmisko vielu rezerves šķīdumi

31. Ķīmiskajām vielām ar pietiekamu šķīdību jāsagatavo rezerves šķīdumi dejonizētā ūdenī vai sintētiskā notekūdens minerālbarotnē, nodrošinot atbilstīgas koncentrācijas (piemēram, 1–5 g/l) (attiecībā uz nešķīstošām un gaistošām ķīmiskajām vielām sk. 5. papildinājumu). Jānosaka rezerves šķīduma *DOC* un *TOC*, un mērījumi jāatkārto katrai jaunai partijai. Ja atšķirība starp *DOC* un *TOC* pārsniedz 20 %, jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas šķīdība ūdenī. Jāsalīdzina *DOC* vai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, mērījumus izdarot ar rezerves šķīduma īpašu analīzi, ar nominālo vērtību, lai noskaidrotu, vai atgūšana ir pietiekami laba (parasti var paredzēt > 90 %). Jānoskaidro, it sevišķi attiecībā uz dispersijām, vai *DOC* var vai nevar izmantot kā analītisku parametru vai arī var izmantot vienīgi kā analītisku paņēmienu, kas piemērots testējamai ķīmiskajai vielai. Dispersijām ir vajadzīga paraugu centrifugēšana. Katrā jaunā partijā ir jānosaka *DOC*, *COD* vai testējamā ķīmiskā viela, veicot īpašu analīzi.

▼M4

32. Jānosaka rezerves šķīduma pH. Galējas vērtības norāda, ka ķīmiskās vielas pievienošana, iespējams, ietekmē aktīvo dūņu pH testēšanas sistēmā. Tādā gadījumā rezerves šķīdums ir jāneitralizē, lai iegūtu pH 7 ± 0,5 apmērā, izmantojot nedaudz neorganiskās skābes vai bāzes, bet izvairoties no testējamās ķīmiskās vielas nogulsnēšanās.

PROCEDŪRA

33. Procedūra ir aprakstīta aktīvo dūņu iekārtu blokiem. Porainā tīģeļa sistēmai procedūra ir nedaudz jāpielāgo.

Sējmateriāla sagatavošana

34. Testēšanas sistēmas sējmateriāls ir jānodrošina testēšanas sākumā vai nu ar aktīvajām dūņām, vai ar sējmateriālu, kas satur mikroorganismus zemā koncentrācijā. Sējmateriāls jāglabā un jāpiesātina ar gaisu istabas temperatūrā līdz tā izmantošanai un jāizmanto 24 h laikā. Pirmajā minētajā gadījumā jāņem aktīvo dūņu paraugs no efektīvi funkcionējošas bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas iekārtas vai laboratorijas attīrīšanas iekārtas, kas galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni, aerācijas tvertnes. Ja ir jāimitē nitrificēšanas apstākļi, dūņas ir jāņem no nitrificējošas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas. Jānosaka suspendēto cieto daļiņu koncentrācija, un, ja vajadzīgs, jāpalielina dūņu koncentrācija, ļaujot tām nogulsnēties, lai testēšanas sistēmai tiktu pievienots pēc iespējas mazāks daudzums. Jānodrošina, lai sausnas satura sākuma koncentrācija būtu aptuveni 2,5 g/l.

35. Otrajā minētajā gadījumā par sējmateriālu jāizmanto attīrīts notekūdens 2–10 ml/l apmērā no sadzīves bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas iekārtas. Lai iegūtu pēc iespējas plašāku baktēriju sugu daudzveidību, var būt lietderīgi pievienot sējmateriālu no dažādiem citiem avotiem, piemēram, virszemes ūdens. Tādā gadījumā aktīvās dūņas izveidosies un attīstīsies testēšanas sistēmā.

Organiskās barotnes dozēšana

36. Jānodrošina, ka gan testēšanas sākumā, gan laikā ieplūdes un attīrītā notekūdens tvertnes, kā arī caurules no ieplūdes tvertnēm un uz attīrītā notekūdens tvertnēm tiek rūpīgi iztīrītas, lai nomazgātu mikrobu kolonijas. Testēšanas sistēmas ir jāmontē termostatējamā telpā (parasti 20–25 °C diapazonā), vai jāizmanto ar ūdens apvalku nodrošināti testēšanas bloki. Jāsagatavo vajadzīgās organiskās barotnes pietiekams tilpums (27.–29. punkts). Sākumā aerācijas trauks un nostādināšanas trauks jāpiepilda ar organisko barotni un jāpievieno sējmateriāls (34. un 35. punkts). Jāsāk tāda aerācija, kas uzturētu dūņu suspensiju un aerāciju, un jāsāk ieplūdes dozēšana un nogulsnējušo dūņu atkārtota apstrāde. Organiskā barotne ir devās jāizvada no testēšanas un kontroles bloku glabāšanas traukiem uz aerācijas traukiem (20. un 21. punkts), un jāsavāc attiecīgie attīrītie notekūdeņi līdzīgos glabāšanas traukos. Lai iegūtu parasto hidrauliskās aiztures laiku 6 stundu apmērā, organisko barotni sūknē ar ātrumu 0,5 l/h. Lai apstiprinātu šo ātrumu, jāizmēra organiskās barotnes dienā dozētais daudzums, atzīmējot barotnes tilpuma samazinājumu glabāšanas traukos. Lai noteiktu ķīmisko vielu periodiskas un vienreizējas pievienošanas ietekmi, būs vajadzīgi citi dozēšanas režīmi.

37. Ja organisko barotni sagatavo izmantošanai periodā, kas pārsniedz vienu dienu, ir vajadzīga dzesēšana 4 °C vai citas piemērotas uzglabāšanas metodes, lai novērstu mikrobu vairošanos un bionoārdīšanos ārpus testēšanas blokiem (29. punkts). Ja izmanto sintētisko notekūdeni, ir iespējams sagatavot un 4 °C uzglabāt koncentrētu rezerves šķīdumu (piemēram, 10 reizes lielāku koncentrāciju par parasto, 28. punkts). Šo rezerves šķīdumu pirms lietošanas var kārtīgi samaisīt ar atbilstīgu daudzumu krāna ūdens. To var arī tieši iesūknēt, atsevišķi iesūknējot atbilstīgu daudzumu krāna ūdens.

▼M4

Testējamās ķīmiskās vielas dozēšana

38. Ieplūdes glabāšanas traukam jāpievieno testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīduma atbilstīgs daudzums (31. punkts), vai arī tas tieši jādozē ar atsevišķu sūkni aerācijas traukā. Parasti vidējai testēšanas *DOC* koncentrācijai ieplūdē jābūt 10–20 mg/l diapazonā, un augstākā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 50 mg/l. Ja testējamā ķīmiskā viela ir ūdenī mazšķīstoša vai ja ir iespējama toksiska iedarbība, *DOC* koncentrācija jāsamazina līdz 5 mg/l vai mazāk, bet tikai tad, ja ir pieejama un tiek īstenota piemērota konkrēta analītiskā metode (dispersētas testējamās ķīmiskās vielas, kas ir ūdenī mazšķīstošas, var pievienot, izmantojot īpašus dozēšanas paņēmienus, sk. 5. papildinājumu).

39. Pēc laikposma, kurā sistēma ir nostabilizējusies un sākusi efektīvi (apm. 80 %) noārdīt organiskās barotnes *DOC*, jāsāk pievienot testējamā ķīmiskā viela. Ir svarīgi pārliecināties, ka visi bloki darbojas vienlīdz efektīvi, pirms tiek pievienota testējamā ķīmiskā viela. Ja tie tā nedarbojas, situāciju parasti var atrisināt, sajaucot atsevišķu bloku dūņas un tās atkārtoti sadalot vienādos daudzumos pa blokiem. Ja izmanto aktīvo dūņu sējmateriālu (aptuveni) 2,5 g/l (saussvars) apmērā, testējamo ķīmisko vielu var pievienot jau no testēšanas sākuma, jo pieaugošu daudzumu tieša pievienošana no paša sākuma nodrošina priekšrocību, ka aktīvās dūņas varēs labāk pielāgoties testējamai ķīmiskajai vielai. Neatkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas veida ir ieteicams regulāros intervālos mērīt attiecīgo plūsmas ātrumu un/vai tilpumus glabāšanas traukā(-os).

Aktīvo dūņu apstrāde

40. Aktīvo dūņu cieto daļiņu koncentrācija testēšanas laikā parasti stabilizējas normas robežās neatkarīgi no izmantotā sējmateriāla 1–3 g/l (saussvars) apmērā atkarībā no organiskās barotnes kvalitātes un koncentrācijas, darbības apstākļiem, klātesošo mikroorganismu veida un testējamās ķīmiskās vielas ietekmes.

41. Ir vai nu jānosaka suspendētās cietās daļiņas aerācijas traukos vismaz reizi nedēļā un jāatbrīvojas no atlikušajām dūņām, lai uzturētu koncentrāciju 1–3 g/l diapazonā (saussvars), vai jākontrolē vidējais dūņu vecums nemainīgā vērtībā parasti 6–10 dienu diapazonā. Ja, piemēram, izvēlas astoņu dienu dūņu aiztures laiku, katru dienu no aerācijas trauka ir jāizņem 1/8 aktīvo dūņu daudzuma un jāatbrīvojas no tās. Tas jāveic katru dienu vai, vēlams, ar automātisku periodiski darbojošos sūkni. Suspendēto cieto daļiņu nemainīgas vai gandrīz nemainīgas koncentrācijas uzturēšana nenodrošina nemainīgu dūņu aiztures laiku, kas ir darbības mainīgais lielums, kurš nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas vērtību attīrītajā notekūdenī.

42. Testēšanas laikā vismaz reizi dienā jānoņem dūņas, kas pielipušas aerācijas trauka un nostādināšanas trauka sienām, lai tās tiktu atkārtoti suspendētas. Regulāri jāpārbauda un jāiztīra visas caurules, lai novērstu bioplēves augšanu. Nogulsnējušās dūņas no nostādināšanas trauka ir atkārtoti jāapstrādā aerācijas traukā, vēlams, ar periodisku sūknēšanu. Porainā tīģeļa sistēmā atkārtota apstrāde nenotiek, bet ir jānodrošina, ka, pirms traukā būtiski pieaug tilpums, tiek ievietoti tīri iekšējie tīģeļi (21. punkts).

43. *Husmann* iekārtas blokiem var būt raksturīga slikta dūņu nogulsnēšanās un zudums. To var novērst, paralēli izmantojot vienu vai vairākus turpmāk norādītos paņēmienus testēšanas un kontroles blokos:

— regulāros intervālos, piemēram, reizi nedēļā, var pievienot svaigas dūņas vai flokulantu (piemēram, 2 ml/trauku 50 g/l $FeCl_3$), bet ir jāpārliecinās, ka nav nekādas testējamās ķīmiskās vielas reakcijas vai nogulsnēšanās $FeCl_3$ ietekmē,

▼M4

— saspiesta gaisa sūkni var aizvietot ar peristaltisko sūkni, tādējādi nodrošinot dūņu recirkulācijas plūsmu, kas aptuveni atbilst izmantojamai ieplūdes plūsmai, un ļaujot nogulsnējušās dūņās izveidoties anaerobai zonai (saspiesta gaisa sūkņa ģeometrija ierobežo atgriezto dūņu minimālo plūsmas ātrumu apmērā, kas ir aptuveni 12 reizes lielāks par ieplūdes ātrumu),

— dūņas no nostādināšanas trauka uz aerācijas trauku var sūknēt periodiski (piemēram, 5 minūtes reizi 2,5 stundās, lai atkārtoti apstrādātu 1–1,5 l/h),

— var izmantot netoksisku pretputošanas līdzekli minimālā koncentrācijā, lai novērstu putu radītos zaudējumus (piemēram, silikoneļļu),

— gaisu caur dūņām nostādināšanas traukā var laist īsos, pēkšņos pūtienos (piemēram, 10 sekundes reizi stundā),

— arī organisko barotni var intervālos dozēt aerācijas traukā (piemēram, 3–10 minūtes reizi stundā).

Paraugu ņemšana un analīze

44. Regulāros intervālos ir jāizmēra aerācijas traukā esošo aktīvo dūņu izšķīdušā oglekļa koncentrācija, temperatūra un pH vērtība. Jānodrošina, lai vienmēr būtu pieejams pietiekami daudz skābekļa (> 2 mg/l) un lai temperatūra tiktu uzturēta vajadzīgajā diapazonā (parasti 20–25 °C). pH ir jāuztur 7,5 ± 0,5 apmērā, aerācijas traukā vai ieplūdē dozējot nelielus daudzumus neorganiskās bāzes vai skābes vai palielinot organiskās barotnes buferspēju (sk. 27. punktu). Nitrificēšanas laikā veidojas skābe, 1 mg N oksidācija rada aptuveni 7 mg CO_3^-. Mērījumu regularitāte ir atkarīga no mērāmā parametra un sistēmas stabilitātes un var būt atšķirīga starp dienas un nedēļas mērījumiem.

45. Jāizmēra *DOC* vai *COD* kontroles un testēšanas trauku ieplūdēs. Jāizmēra testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē, veicot īpašu analīzi vai izdarot aplēses no koncentrācijas rezerves šķīdumā (31. punkts), izmantotā tilpuma un testēšanas blokā dozētā notekūdens daudzuma. Ieteicams aprēķināt testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, lai samazinātu koncentrācijas datu mainību.

46. Jāpaņem piemēroti paraugi no savāktā attīrītā notekūdens (piemēram, 24 h maisījumi) un jāfiltrē cauri membrānai ar poru izmēru 0,45 μm apmērā vai jācentrifugē aptuveni 40 000 m/s^2 ātrumā kādas 15 minūtes. Centrifugēšana jāizmanto gadījumā, ja filtrēšana ir apgrūtināta. Vismaz divas reizes ir jānosaka *DOC* vai *COD*, lai izmērītu galīgo bionoārdīšanos un, ja vajadzīgs, primāro bionoārdīšanos, veicot testējamai ķīmiskajai vielai piemērotu analīzi.

47. *COD* izmantošana pie zemām koncentrācijām var radīt analītiskas problēmas, tāpēc to ieteicams izmantot tikai tad, ja ir izmantota pietiekami augsta testēšanas koncentrācija (aptuveni 30 mg/l). Turklāt ķīmiskajām vielām ar augstu adsorbciju ir ieteicams dūņās adsorbētās ķīmiskās vielas daudzumu mērīt, izmantojot testējamai ķīmiskajai vielai piemērotu analītisko paņēmienu.

48. Paraugu ņemšanas regularitāte ir atkarīga no paredzētā testēšanas ilguma. Ieteicamā regularitāte ir trīs reizes nedēļā. Tiklīdz bloki efektīvi darbojas, jānogaida viena līdz ne vairāk kā sešas nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas, lai pielāgošanās sasniegtu stabilu stāvokli. Vēlams iegūt vismaz 15 derīgas vērtības plato fāzē (59. punkts), kas parasti ilgst trīs nedēļas, lai novērtētu testēšanas rezultātus. Testēšanu var beigt, ja ir sasniegta pietiekama noārdīšanas pakāpe (piemēram, > 90 %) un ja ir pieejamas šīs 15 vērtības, kas atspoguļo trīs nedēļas katru darbdienu veiktās analīzes. Parasti testēšanas ilgums nedrīkstētu pārsniegt 12 nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas.

▼M4

49. Ja dūņas nitrificējas un ja ir jāizpēta testējamās ķīmiskās vielas ietekme uz nitrificēšanos, vismaz reizi nedēļā ir jāanalizē paraugi no testēšanas un kontroles bloku attīrītā notekūdens, lai konstatētu amoniju un/vai nitrītu kopā ar nitrātu.

50. Visas analīzes ir jāveic pēc iespējas ātrāk, it sevišķi, ja nosaka slāpekli. Ja analīzes ir jāatliek, paraugi ir jāglabā pilnās, cieši aizvākotās pudelēs 4 °C un tumsā. Ja paraugi ir jāglabā vairāk nekā 48 h, tie jāuzglabā dziļi saldēti, ar paskābināšanu (piemēram, 10 ml/l no 400 g/l sērskābes šķīduma) vai pievienojot piemērotu toksisku vielu (piemēram, 20 ml/l no 10 g/l dzīvsudraba (II) hlorīda šķīduma). Ir jānodrošina, ka uzglabāšanas paņēmiens neietekmē analīzes rezultātus.

Testēšanas bloku savienošana

51. Ja izmantos savienošanu (3. papildinājums), katru dienu ir jāapmaina vienāds daudzums aktīvo dūņu (150–1 500 ml aerācijas traukiem, kas satur trīs litrus šķidruma) starp testēšanas bloka un tā kontroles bloka aerācijas traukiem. Ja testējamā ķīmiskā viela spēcīgi adsorbējas uz dūņām, jānomaina vienīgi nostādināšanas trauku dzidrais šķīdums. Abos gadījumos ir jāizmanto korekcijas koeficients, lai aprēķinātu testēšanas rezultātus (55. punkts).

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

52. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvars katrā plānotajā novērtējumā, izmantojot šādu vienādojumu:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kur:

D_t = *DOC* vai *COD* noārdīšanās % laikā t;

C_s = *DOC* vai *COD* ieplūdē testējamās ķīmiskās vielas dēļ, ko ieteicams aplēst no rezerves šķīduma (mg/l);

E = izmērītā *DOC* vai *COD* vērtība testēšanas bloka attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l);

E_o = izmērītā *DOC* vai *COD* vērtība kontroles bloka attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l).

53. Organiskās barotnes *DOC* vai *COD* noārdīšanās kontroles blokā ir lietderīga informācija, lai novērtētu aktīvo dūņu bionoārdīšanās aktivitāti testēšanas laikā. Noārdīšanās īpatsvars ir jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kur:

D_B = organiskās barotnes *DOC* vai *COD* noārdīšanās % kontroles blokā laikā t;

C_M = organiskās barotnes *DOC* vai *COD* kontroles ieplūdē (mg/l).

▼M4

Nav obligāti, bet var arī aprēķināt *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvaru organiskās barotnes dēļ kopā ar testējamo ķīmisko vielu testēšanas blokā pēc vienādojuma:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kur:

D_T = kopējās testēšanas ieplūdes *DOC* vai *COD* noārdīšanās %;

C_T = kopējās testēšanas ieplūdes *DOC* vai *COD* vai *DOC* vai *COD*, kas aprēķināts no rezerves šķīdumiem (mg/l).

54. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās, ja tā ir izmērīta ar konkrētu analītisko metodi katra plānotā novērtējuma laikā pēc vienādojuma:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kur:

D_{ST} = testējamās ķīmiskās vielas primārās noārdīšanās % laikā t;

S_i = izmērītā vai aplēstā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē (mg/l);

S_e = izmērītā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas attīrītajā notekūdenī (mg/l).

55. Ja ir izmantots savienošanas režīms, testējamās ķīmiskās vielas atšķaidīšanās aerācijas traukā ir jākompensē ar dūņu apmaiņu, izmantojot korekcijas koeficientu (sk. 3. papildinājumu). Ja ir izmantots vidējais hidrauliskās aiztures laiks 6 h apmērā un ja ir apmainīta puse no aktīvo dūņu daudzuma aerācijas traukā, noteiktās dienas noārdīšanās vērtības (D_t, 52. punkts) ir jākoriģē, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas patieso noārdīšanās pakāpi D_{tc} ar vienādojumu:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Testēšanas rezultātu izteikšana

56. Ir grafiski jāattēlo noārdīšanās īpatsvars D_t (vai D_{tc}) un D_{st}, ja pieejams, attiecībā pret laiku (sk. 2. papildinājumu). No testējamās ķīmiskās vielas (*per se* vai kā *DOC*) noārdīšanās līknes formas var izdarīt dažus secinājumus par noārdīšanas procesu.

Adsorbcija

57. Ja ir novērota testējamās ķīmiskās vielas *DOC* augsta noārdīšanās pakāpe testēšanas sākumā, testējamā ķīmiskā viela, iespējams, tiek noārdīta ar adsorbciju uz aktīvo dūņu cietajām daļiņām. To ir iespējams pierādīt, nosakot adsorbēto testējamo ķīmisko vielu ar īpašu analīzi. Parasti adsorbējamu ķīmisko vielu *DOC* noārdīšanās pakāpe nesaglabājas augsta visā testēšanas laikā, proti, parasti noārdīšanās pakāpe ir augsta sākumā un pēc tam tā pakāpeniski samazinās līdz līdzsvara vērtībai. Ja tomēr adsorbējamā testējamā ķīmiskā viela kaut kādā veidā spēja izraisīt mikrobu populācijas aklimatizāciju, testējamās ķīmiskās vielas *DOC* noārdīšanās pēc tam pieaugtu un sasniegtu augstu plato vērtību.

▼M4

Kavējuma fāze

58. Tāpat kā statiskos, arī skrīninga testos daudzām testējamām ķīmiskajām vielām ir vajadzīga kavējuma fāze, pirms notiek pilnīga bionoārdīšanās. Kavējuma fāzē noārdošo baktēriju aklimatizācija vai pielāgošanās notiek, testējamai ķīmiskajai vielai gandrīz nemaz nenoārdoties, savukārt tad sākas šo baktēriju vairošanās. Šī fāze beidzas, un noārdīšanās fāze sākas brīdī, kad ir noārdījušies aptuveni 10 % no testējamās ķīmiskās vielas sākotnējā daudzuma (pēc adsorbcijas, ja tāda notiek). Kavējuma fāze nereti ir ļoti mainīgs rādītājs, kam ir slikta atkārtojamība.

Plato fāze

59. Nepārtrauktas testēšanas noārdīšanās līknes plato fāzi definē kā fāzi, kurā notiek vislielākā noārdīšanās. Plato fāzei jāilgst vismaz trīs nedēļas un jābūt aptuveni 15 izmērītām derīgām vērtībām.

Testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vidējā pakāpe

60. Jāaprēķina vidējā vērtība no testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vērtībām (D_t) plato fāzē. Noapaļojot to līdz tuvākajam veselajam skaitlim (1 %), iegūst testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi. Ieteicams arī aprēķināt vidējās vērtības 95 % ticamības intervālu.

Organiskās barotnes noārdīšanās

61. Ir grafiski jāattēlo organiskās barotnes *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvars kontroles blokā (D_B) attiecībā pret laiku. Jānorāda noārdīšanās vidējā pakāpe, kuru aprēķina tāpat kā testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi (60. punkts).

Norādes par bionoārdīšanos

62. Ja testējamā ķīmiskā viela būtiski neadsorbējas uz aktīvajām dūņām un ja noārdīšanās līknei ir tipiska bionoārdīšanās līknes forma ar kavējuma, noārdīšanās un plato fāzēm (58. un 59. punkts), izmērīto noārdīšanos var droši attiecināt uz bionoārdīšanos. Ja sākumā ir novērota augsta noārdīšanās pakāpe, imitācijas testā nevar nošķirt bioloģiskos un abiotiskos noārdīšanās procesus. Šādos gadījumos un gadījumos, kad pastāv šaubas par bionoārdīšanos (piemēram, ja notiek atdalīšanās), ir jāanalizē adsorbētās testējamās ķīmiskās vielas vai jāveic papildu statiskie bionoārdīšanās testi, pamatojoties uz parametriem, kas skaidri uzrāda bioloģiskus procesus. Šādi testi ietver skābekļa uzņemšanas metodes (šā pielikuma C.4.-D, C.4.-E un C.4.-F nodaļa (6)) vai testēšanu ar oglekļa dioksīda veidošanās mērīšanu (šā pielikuma C.4.-C nodaļa (6)), vai *ISO* brīvā tilpuma metodi (18), izmantojot iepriekš eksponētu sējmateriālu no imitācijas testa. Ja ir izmērīta gan *DOC*, gan konkrētas ķīmiskās vielas noārdīšanās, būtiskas atšķirības (pirmā minētā ir zemāka par otro) starp noārdīšanās īpatsvariem norāda uz organisku starpproduktu klātbūtni attīrītajos notekūdeņos, kurus, iespējams, ir grūtāk noārdīt nekā ķīmisko pamatvielu.

Testēšanas rezultātu derīgums

63. Informācija par sējmateriāla normālu bionoārdīšanos ir iegūta, ja ir noteikta organiskās barotnes noārdīšanās pakāpe (53. punkts) kontroles blokā. Testēšanu uzskata par derīgu, ja *DOC* vai *COD* noārdīšanās pakāpe kontroles blokā(-os) ir > 80 % pēc divām nedēļām un ja nav iegūti neparasti novērojumi.

▼M4

64. Ja ir izmantota viegli bionoārdāma (atsauce) ķīmiskā viela, bionoārdīšanās pakāpei (D_t, 52. punkts) jābūt > 90 %.

65. Ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos, vidējai koncentrācijai attīrītajos notekūdeņos jābūt < 1 mg/l amonjakam-N un < 2 mg/l nitrītam-N.

66. Ja nav atbilstības šiem kritērijiem (63.–65. punkts), testēšana ir jāatkārto ar sējmateriālu no cita avota, ir jātestē ķīmiskā standartviela un ir jāpārskata visas testēšanas procedūras.

Testēšanas pārskats

67. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— identifikācijas dati,

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālās un ķīmiskās īpašības.

Testēšanas apstākļi:

— testa sistēmas veids un jebkādas izmaiņas, lai testētu nešķīstošas un gaistošas ķīmiskās vielas,

— organiskās barotnes veids,

— rūpniecisko notekūdeņu daļa un veids notekūdeņos, ja tas ir zināms,

— sējmateriāls, īpašības un paraugu ņemšanas vieta(-as), koncentrācija un jebkāda iepriekšēja apstrāde,

— testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdums – *DOC* un *TOC* saturs, sagatavošanas veids, ja tā ir suspensija, izmantotā testēšanas koncentrācija, pamatojums, ja *DOC* ir ārpus 10–20 mg/l diapazona, pievienošanas metode, pirmās pievienošanas datums, jebkādas izmaiņas,

— vidējais dūņu vecums un vidējais hidrauliskās aiztures laiks, dūņu zuduma metode, apjoma palielināšanās novēršanas metode, dūņu zudums utt.,

— izmantotie analītiskie paņēmieni,

— testēšanas temperatūra,

— dūņu apjoma palielināšanās īpašības, dūņu daudzuma indekss (turpmāk – *SVI*), maisījumā suspendētās cietās daļiņas (turpmāk – *MLSS*),

— jebkādas novirzes no standarta procedūrām un jebkādi apstākļi, kas, iespējams, ir ietekmējuši rezultātus.

Testēšanas rezultāti:

— visi izmērītie dati (*DOC*, *COD*, īpašās analīzes, pH, temperatūra, skābekļa koncentrācija, suspendētās cietās daļiņas, N ķīmiskās vielas, ja vajadzīgs,

— visas aprēķinātās D_t (vai D_{tc}), D_B un D_{St} vērtības tabulas formātā un noārdīšanās līknes,

— informācija par kavējuma un plato fāzēm, testēšanas ilgumu, testējamās ķīmiskās vielas un organiskās barotnes noārdīšanās pakāpi kontroles blokā kopā ar statistikas informāciju un paziņojumiem par bionoārdīšanos un testēšanas derīgumu,

— rezultātu apspriešana.

▼**M4**

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bionoārdīšanās spējas noteikšana".

(7) Šā pielikuma C.12. nodaļa "Biodegradācija – modificēts *SCAS* tests".

(8) Šā pielikuma C.19. nodaļa "Adsorbcijas koeficienta (K_{OC}) noteikšana uz augsnes un uz kanalizācijas nosēdumiem ar augstas izšķiršanas šķidruma hromatogrāfiju (*HPLC*).

(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. 91-98 pp. 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.

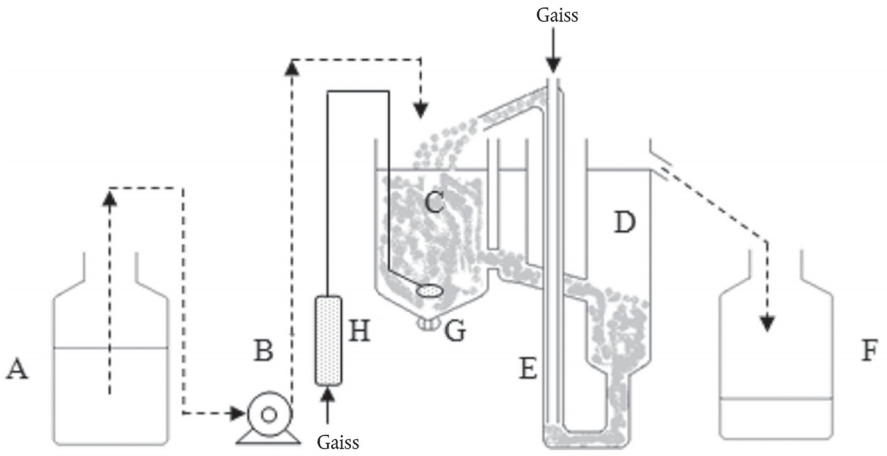
▼M4

1. papildinājums

1. attēls

Bionoārdīšanās novērtējumā izmantotais aprīkojums

Husmann bloks



A. Glabāšanas trauks

B. Dozētājsūknis

C. Aerācijas kamera (3 l kapacitāte)

D. Nostādināšanas trauks

E. Saspiesta gaisa sūknis

F. Savākšanas trauks

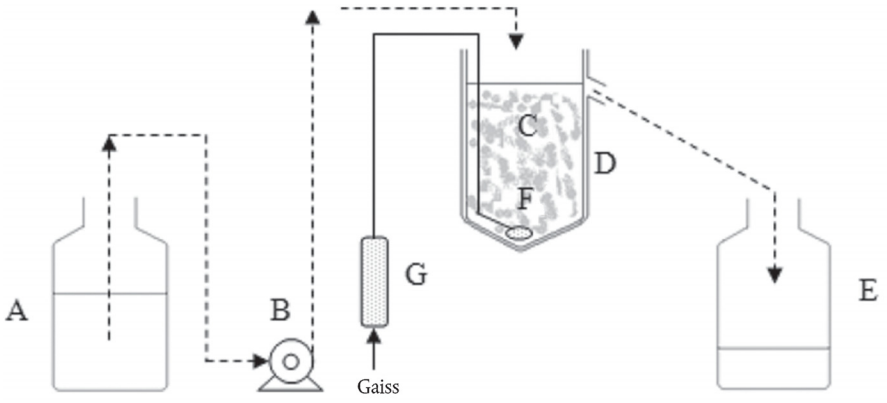
G. Aerators

H. Gaisa plūsmas mērītājs

2. attēls

Bionoārdīšanās novērtējumā izmantotais aprīkojums

Porainais tīģelis



A. Glabāšanas trauks

B. Dozētājsūknis

C. Porainais aerācijas trauks

D. Ārējais necaurlaidīgais trauks

E. Savākšanas trauks

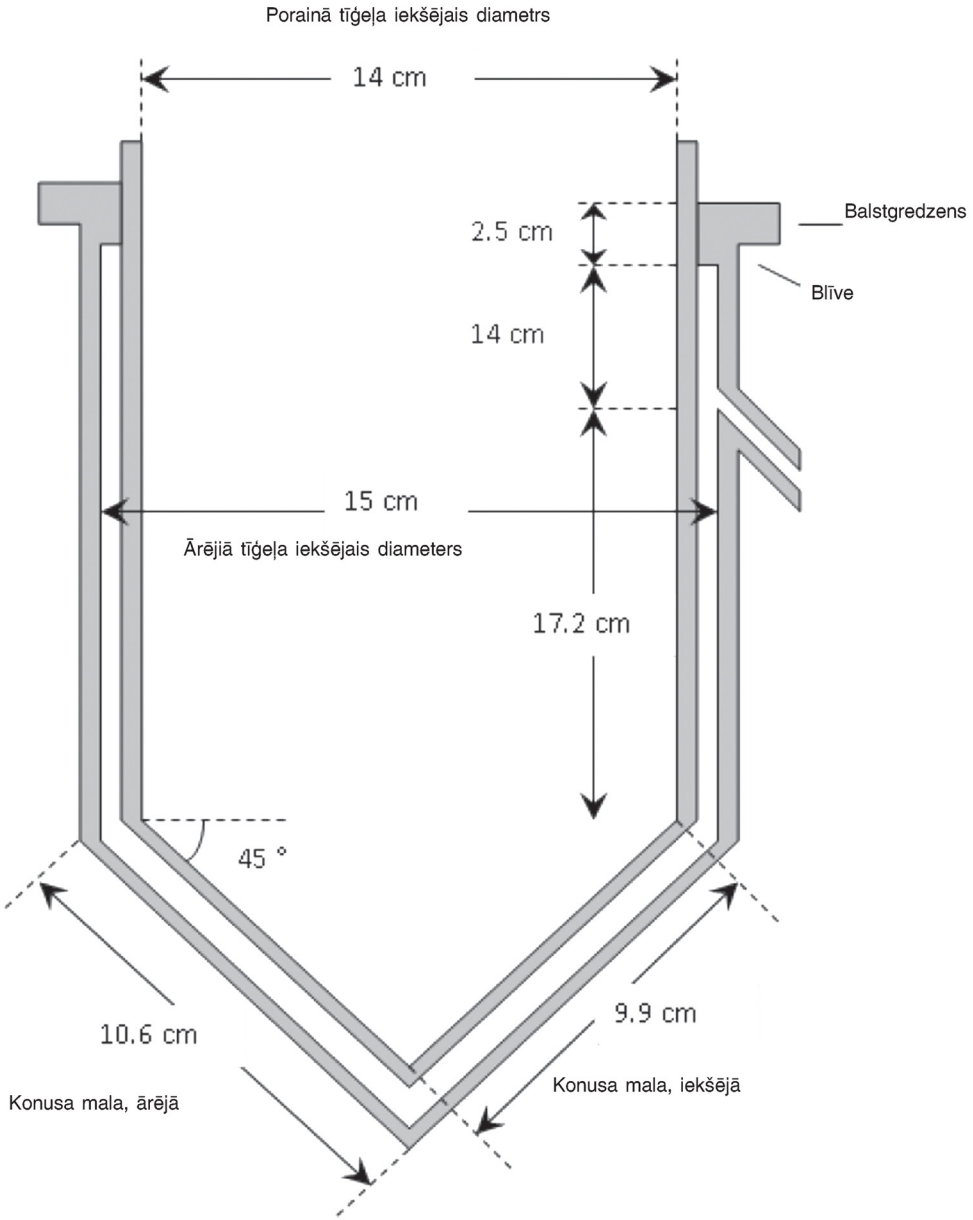
F. Difuzors

G. Gaisa plūsmas mērītājs

▼**M4**

3. attēls

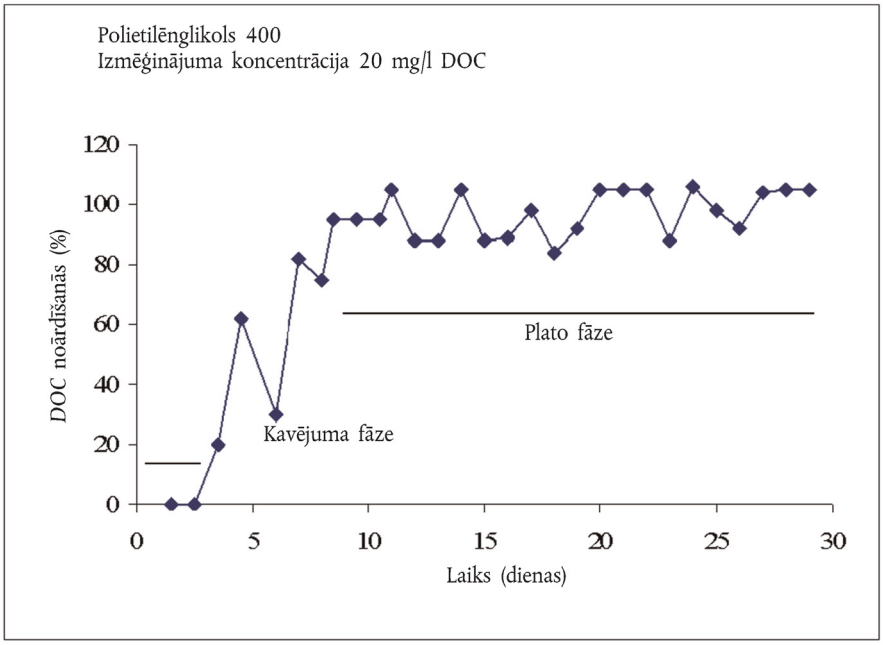
Trīslitru porainā tīģeļa aerācijas trauka daļas



▼**M4**

2. papildinājums

Noārdīšanās līknes piemērs



▼**M4**

3. papildinājums

[INFORMATĪVS]

TESTĒŠANAS BLOKU SAVIENOŠANA

Nolūkā izlīdzināt mikrobu populācijas dūņās testēšanas blokā, kas saņem notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu, un kontroles blokā, kurš saņem tikai notekūdeni, tika ieviesta dūņu ikdienas apmaiņa (1). Šo procedūru sauc par savienošanu, un tā ir savienoto bloku metode. Savienošanu sākotnēji veica, izmantojot *Husmann* aktīvo dūņu blokus, bet tā ir īstenota arī ar porainā tīģeļa blokiem (2) (3). Netika atklātas nekādas būtiskas atšķirības rezultātos starp nesavienotiem un savienotiem blokiem neatkarīgi no tā, vai izmantoja *Husmann* vai poraina tīģeļa bloku, tāpēc nav nekādu priekšrocību, kas kompensētu iztērēto laiku un enerģiju, kura vajadzīga savienotajiem blokiem.

Dūņu apmaiņas var radīt iespaidu, ka notiek ievērojama noārdīšanās, jo daļa testējamās ķīmiskās vielas tiek pārvietota un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas testēšanas un kontroles bloku attīrītajos notekūdeņos kļūst gandrīz vienādas. Tādējādi ir jāizmanto korekcijas koeficienti, kas ir atkarīgi no apmainītās daļas un vidējā hidrauliskās aiztures laika. Ir publicēti arī papildu dati par šo aprēķinu (1).

Ir jāaprēķina koriģētā *DOC* vai *COD* noārdīšanās pakāpe, izmantojot vispārīgu formulu:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kur:

D_{tc} = koriģētais *DOC* vai *COD* noārdīšanās %;

D_t = noteiktais *DOC* vai *COD* noārdīšanās %;

a = apmaiņas daļa no aktīvo dūņu bloku daudzuma;

r = vidējais hidrauliskās aiztures laiks (h).

Ja, piemēram, tiek apmainīta puse aerācijas tvertnes daudzuma (a = 0,5) un ja vidējais hidrauliskās aiztures laiks ir 6 h, korekcijas formula ir:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATŪRA

(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. 113. – 138. lpp. 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. papildinājums

AKTĪVO DŪŅU INHIBĒŠANAS NOVĒRTĒJUMS

Testējamo ķīmisko vielu process

1. Pastāv iespēja, ka ķīmisko vielu (vai notekūdeni) nevar noārdīt imitācijas testā un ka tai ir inhibējoša ietekme uz dūņu mikroorganismiem. Citas ķīmiskās vielas bionoārdās zemās koncentrācijās, bet ir inhibējošas augstākā koncentrācijā (hormēze). Inhibējoša ietekme var parādīties agrīnā posmā vai var tikt noteikta, piemērojot, toksicitātes testu ar sējmateriālu, kas ir līdzīgs vai identisks imitācijas testā izmantotajam (1). Šādas metodes ietver skābekļa uzņemšanas inhibēšanu (šā pielikuma C.11. nodaļa (2) un ISO 8192 (3)) vai dūņu organismu vairošanās inhibēšanu (ISO 15522 (4)).

2. Imitācijas testā inhibēšanu uzrādīs izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – *DOC*) vai ķīmiskā skābekļa patēriņa (turpmāk – *COD*) atšķirība starp attīrīto notekūdeni no testēšanas bloka un no kontroles bloka, proti, šīs vērtības ir augstākas nekā *DOC*, ko pievienoja kā testējamo ķīmisko vielu. Izteikts citādi, organiskās barotnes *DOC* (un bioķīmiskā skābekļa patēriņa (turpmāk – *BOD*), *COD* un/vai NH^{+}_{4}) noārdīšanās īpatsvars attīrīšanas laikā samazināsies testējamās ķīmiskās vielas klātbūtnes dēļ. Ja tas tā notiek, tests ir jāatkārto, samazinot testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, līdz ir sasniegts līmenis, pie kura nenotiek inhibēšana, un, iespējams, turpinot samazināt šo koncentrāciju, līdz testējamā ķīmiskā viela bionoārdās. Tomēr, ja testējamā ķīmiskā viela (vai notekūdens) negatīvi ietekmē procesu visos koncentrācijas līmeņos, tas liecina, ka šo ķīmisko vielu ir grūti, varbūt pat neiespējami apstrādāt bioloģiski, bet var būt lietderīgi atkārtot testēšanu ar aktīvajām dūņām no cita avota un/vai ar dūņu pakāpeniskāku aklimatizāciju.

3. Savukārt, ja testējamā ķīmiskā viela imitācijas testā tiek bionoārdīta pirmajā mēģinājumā, tās koncentrācija ir jāpalielina, ja tas vajadzīgs, lai uzzinātu, vai šī ķīmiskā viela varētu būt inhibējoša.

4. Cenšoties noteikt inhibēšanas pakāpes, jāatceras, ka aktīvo dūņu populācija var mainīties, tādēļ laika gaitā mikroorganismi var izveidot toleranci pret inhibējošu ķīmisko vielu.

5. Inhibēšanas pakāpes aprēķins:

Testēšanas un kontroles bloka *BOD*, *DOC*, *COD* utt. kopējo noārdīšanās īpatsvaru (R_o) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

kur:

I = *BOD*, *DOC*, *COD* utt. koncentrācija ieplūdē testēšanas vai kontroles traukos (mg/l);

E = attiecīgās koncentrācijas attīrītajos notekūdeņos (mg/l).

I un E ir jākoriģē *DOC* vajadzībām testējamās ķīmiskās vielas testēšanas blokos dēļ, jo pretējā gadījumā inhibēšanas īpatsvara aprēķins nebūs pareizs.

▼**M4**

Testējamās ķīmiskās vielas klātbūtnes izraisīto inhibēšanas pakāpi var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$\% \text{ inhibēšanas} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

kur:

R_c = noārdīšanās īpatsvars kontroles traukos;

R_t = noārdīšanās īpatsvars testēšanas traukos.

LITERATŪRA

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Šā pielikuma C.11. nodaļa "Biodegradācija – aktīvo dūņu respirācijas inhibīcijas tests".

(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. papildinājums

Ūdenī mazšķīstošas un gaistošas testējamās ķīmiskās vielas

Ūdenī mazšķīstošas ķīmiskās vielas

Par ūdenī mazšķīstošu un nešķīstošu ķīmisko vielu testēšanu testos, kas imitē notekūdeņu attīrīšanu, ir publicēts maz pārskatu (1) (2) (3).

Nav vienas testējamās ķīmiskās vielas dispersijas metodes, kas būtu piemērojama visām nešķīstošajām ķīmiskajām vielām. Divi no četriem metodes veidiem, kas aprakstīti ISO 10634 (4), varētu būt piemēroti mēģinājumiem disperģēt testējamās ķīmiskās vielas imitācijas testēšanā, proti, emulgatoru izmantošana un/vai ultraskaņas enerģija. Ir jānosaka stabilitāte vismaz izrietošās dispersijas 24 h periodos. Pēc tam atbilstīgi stabilizētas dispersijas, kas atrodas nepārtraukti maisītā rezervuārā (38. punkts), devās pievieno aerācijas tvertnei atsevišķi no sadzīves (vai sintētiskā) notekūdens.

Ja dispersijas ir stabilas, ir jāizpēta, kā testējamo ķīmisko vielu var noteikt disperģētā veidā. Visticamāk, *DOC* nebūs piemērots, tāpēc testējamai ķīmiskajai vielai būs jānosaka īpaša analītiskā metode, ko varētu piemērot attīrītajiem notekūdeņiem, notekūdeņu cietajām daļiņām un aktīvajām dūņām. Pēc tam testējamās ķīmiskās vielas sadalīšanos aktīvo dūņu procesa imitācijā noteiktu šķidrajā un cietajā fāzē. Tādējādi tiktu noteikta "masas bilance", lai pieņemtu lēmumu, vai testējamā ķīmiskā viela ir bionoārdījusies. Tomēr tas norādītu vienīgi uz primāro bionoārdīšanos. Galīgo bionoārdīšanos jācenšas parādīt, veicot respirometrisko testēšanu attiecībā uz vieglu bionoārdīšanos (šā pielikuma C.4.-C, C.4.-F vai C.4.-D nodaļa (5)), kā sējmateriālu izmantojot dūņas, kas pakļautas testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai imitācijas testā.

Gaistošas ķīmiskās vielas

Notekūdeņu attīrīšanas imitāciju piemērošana gaistošām ķīmiskajām vielām ir gan apstrīdama, gan problemātiska. Tāpat kā par ūdenī mazšķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām ir publicēts ļoti maz pārskatu, kuros būtu aprakstīti imitācijas testi ar gaistošām ķīmiskajām vielām. Pilnīgas maisīšanas iekārtas tradicionāls veids tiek pielāgots, noblīvējot aerācijas tvertni un nosēdtvertni, mērot un kontrolējot gaisa plūsmu ar plūsmas mērītājiem un izejas gāzi laižot cauri uztvērējiem, lai savāktu gaistošo organisko vielu. Dažos gadījumos izmanto vakuumsūkni, lai izejas gāzi ievilktu "aukstā" uztvērējā vai caurpūtes uztvērējā, kas satur *Tenax* un silikagēlu gāzes hromatogrāfiskajai analīzei. Uztvērējā esošo testējamo ķīmisko vielu var noteikt analītiski.

Testēšanu veic divās daļās. Blokus vispirms darbina bez dūņām, bet ar sintētisko notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu, ko iesūknē aerācijas tvertnē. Dažas dienas vāc un analizē ieplūdes, attīrītā notekūdens un izejas gāzes paraugus, lai konstatētu testējamo ķīmisko vielu. No apkopotajiem datiem var aprēķināt tās testējamās ķīmiskās vielas īpatsvaru (R_{vs}), kas atdalīta no sistēmas.

Pēc tam veic parasto bioloģisko testu (ar dūņām) darbības apstākļos, kas ir identiski atdalīšanas pētījumam. Veic arī *DOC* vai *COD* mērījumus, lai pārliecinātos, ka bloki strādā efektīvi. Testa pirmajā daļā veic periodiskas analīzes, lai noteiktu testējamo ķīmisko vielu ieplūdē, attīrītajā notekūdenī un izejas gāzē. Pēc aklimatizācijas analīzes veic biežāk. Arī šajā gadījumā no datiem stabilā stāvoklī var aprēķināt testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvaru šķidrajā fāzē, kuru izraisījuši visi procesi (R_T) (fiziskie un bioloģiskie), kā arī daļu (R_V), kas atdalīta no sistēmas.

▼**M4**

Aprēķins

a) Nebioloģiski testējamā materiāla, kas atdalīts no sistēmas, īpatsvaru (R_{VP}) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kur:

R_{VP} = testējāmās ķīmiskās vielas noārdīšanās izgaistot (%);

S_{VP} = testējamā ķīmiskā viela, kas savākta uztvērējā un izteikta kā koncentrācijas ekvivalents šķidrajā fāzē (mg/l);

S_{IP} = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ieplūdē (mg/l).

b) Bioloģiski testējamā materiāla, kas atdalīts no sistēmas, īpatsvaru (R_V) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kur:

R_V = testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās bioloģiskajā testēšanā izgaistot (%);

S_V = testējamā ķīmiskā viela, kas bioloģiskajā testēšanā savākta uztvērējā un izteikta kā koncentrācijas ekvivalents ieplūdē (mg/l);

S_I = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ieplūdē (mg/l).

c) Bioloģiski testējamās ķīmiskās vielas īpatsvaru (R_T), kas noārdījies, pateicoties visiem procesiem, var noteikt pēc šāda vienādojuma:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kur:

S_E = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija (šķidrajā) attīrītajā notekūdenī (mg/l).

d) Tādējādi ar bionoārdīšanos un adsorbciju noārdīto īpatsvaru (R_{BA}) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Jāveic atsevišķi testi, lai noteiktu, vai testējamā ķīmiskā viela ir tikusi adsorbēta. Ja ir, var veikt turpmāku korekciju.

e) Salīdzinājums starp testējamās ķīmiskās vielas daļu, kas atdalīta no sistēmas bioloģiskajā (R_v) un nebioloģiskajā (R_{vp}) testēšanā, atspoguļo vispārējo ietekmi, kāda bioloģiskajai attīrīšanai ir bijusi uz testējamās ķīmiskās vielas emisiju gaisā.

Piemērs. *Benzols*

Dūņu aiztures laiks = 4 dienas

Sintētiskais notekūdens, aiztures laiks = 8 h

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Tādējādi:

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % un R_{BA} = 85 %.

Tika pieņemts, ka benzols netika adsorbēts uz dūņām.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bionoārdīšanās spējas noteikšana".

▼M4

6. papildinājums

Dūņu aiztures laika ietekme uz ķīmisko vielu attīrāmību

IEVADS

1. Teksta pamatdaļā aprakstītā metode tika izstrādāta, lai noskaidrotu, vai testētās ķīmiskās vielas (parasti tās, par kurām ir zināms, ka tās būtībā, bet ne viegli, ir bionoārdāmas) var tikt bionoārdītas noteiktajās robežās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Rezultāti ir izteikti noārdīšanas īpatsvarā un bionoārdīšanās īpatsvarā. Aktīvo dūņu bloku darbības apstākļi un ieplūdes izvēle paredz samērā plašas variācijas attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju attīrītajā notekūdenī. Testēšanu veic tikai ar vienu dūņu cieto daļiņu nominālo koncentrāciju vai ar vienu nominālo dūņu aiztures laiku (turpmāk – *SRT*), un aprakstītie dūņu zuduma režīmi var nozīmēt, ka *SRT* var būtiski mainīties testēšanas laikā gan starp dienām, gan vienas dienas laikā.

2. Šeit aprakstītajā gadījumā (1) (2) *SRT* kontrolē daudz šaurākās robežās katrā 24 h periodā (tāpat kā notiek ar lieliem apjomiem), kā rezultātā attīrītajos notekūdeņos ir nemainīgāka koncentrācija. Ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni, jo tas nodrošina nemainīgākus un augstākus noārdīšanās īpatsvarus. Tāpat tiek izpētīta vairāku *SRT* vērtību ietekme, savukārt detalizētākā pētījumā var noteikt temperatūras diapazona ietekmi uz koncentrāciju attīrītajos notekūdeņos.

3. Vēl nav vispārpieņemtas vienprātības attiecībā uz to, kuri kinētikas modeļi darbojas, kad ķīmiskās vielas bionoārdās notekūdeņu attīrīšanas apstākļos. Tika izraudzīts un apkopotajiem datiem piemērots *Monod* baktēriju vairošanās un substrātu izmantošanas modelis (1) (2), jo metodes mērķis bija piemērošana tikai tādām ķīmiskajām vielām, kas tiek izstrādātas daudzu tonnu apmērā, novedot pie koncentrācijām notekūdenī, kuras pārsniedz 1 mg/l. Vienkāršotā modeļa un veikto pieņēmumu derīgumu noteica, izmantojot spirtu etoksilātu rindas ar dažādām primārās bionoārdīšanās pakāpēm (2) (3).

Piezīme. Šis metodes variants stingri pieturas pie šīs testēšanas metodes C.10.-A teksta, un ir uzskaitītas tikai tās daļas, kas atšķiras.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

4. Aktīvo dūņu porainā tīģeļa bloki, kas paredzēti (gandrīz) nepārtrauktu maisījuma zudumu nodrošināšanai, ļaujot ļoti precīzi kontrolēt dūņu aiztures laiku (*SRT* vai θ_s), tiek darbināti nesavienotā režīmā dažādos *SRT* un, ja vēlas, dažādās temperatūrās. Parasti aiztures laiks ir 2–10 dienas un temperatūra ir 5–20 °C. Notekūdeni, vēlams, sadzīves, un testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu atsevišķi devās pievieno blokiem ātrumā, kas nodrošina vajadzīgo dūņu aiztures laiku (3–6 stundas) un vajadzīgo testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju ieplūdē. Paralēli tiek darbināti kontroles bloki, kas nesaņem testējamo ķīmisko vielu, lai būtu iespējams salīdzinājums.

5. Var izmantot cita veida iekārtas, bet ir ļoti jāuzmanās, lai nodrošinātu, ka tiek panākta laba *SRT* kontrole. Piemēram, izmantojot iekārtas, kas ietver nosēdtvertni, var būt vajadzīga iespēja nodrošināt cieto daļiņu zudumus ar iekārtas attīrīto notekūdeni. Jāveic arī īpaši drošības pasākumi, lai izvairītos no kļūdām dūņu daudzuma nosēdtvertnē variāciju dēļ.

▼M4

6. Blokus darbina katrā noteiktajā apstākļu kopumā un pēc tam, kad iestājies līdzsvars, apmēram triju nedēļu periodā nosaka vidējās stabila stāvokļa testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas attīrītajos notekūdeņus un, ja vēlas, *DOC*. Papildus testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvara un, ja vēlas, *DOC* noteikšanai grafiskā veidā attēlo attiecības starp iekārtas darbības apstākļiem un koncentrāciju attīrītajā notekūdenī. No tā var aprēķināt nosacītas kinētikas konstantes un var prognozēt apstākļus, kādos testējamo ķīmisko vielu var apstrādāt.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

7. Piemēro C.10.-A nodaļas 12. un 13. punktu.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

8. Piemēro C.10.-A nodaļas 14. un 15. punktu.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

9. Piemēro C.10.-A nodaļas 16. punktu.

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

10. Piemēro C.10.-A nodaļas 17. un 18. punktu.

METODES APRAKSTS

Iekārta

11. Piemēroti ir izmantot pielāgotu porainā tīģeļa sistēmu (6.1. papildinājums). To veido iekšējais trauks (vai ieliktnis), kas izgatavots no 3,2 mm bieza poraina polipropilēna ar poru izmēru aptuveni 90 μm apmērā, un šuve ir pārlaidmetināta. (Tas nodrošina, ka bloks ir izturīgāks nekā C.10.-A nodaļas 21. punktā aprakstītais.) Ieliktni uzstāda necaurlaidīgā polietilēna ārējā traukā, kas sastāv no divām daļām: apaļas pamatnes, kurā ieurbti caurumi, lai nodrošinātu divas gaisa līnijas un dūņu zuduma līniju, un augšējā cilindra, ko uzskrūvē uz pamatnes un kam ir atvere, kura izvietota tā, lai porainā tīģeļa traukā piegādātu zināmu tilpumu (3 l). Viena no gaisa līnijām ir aprīkota ar difuzoro akmeni, savukārt otra ir atvērta un izvietota taisnleņķos attiecībā pret akmeni tīģelī. Šī sistēma rada vajadzīgo turbulenci, lai nodrošinātu, ka tīģeļa saturs tiek pilnībā samaisīts, kā arī nodrošina izšķīdušā skābekļa koncentrācijas virs 2 mg/l.

12. Atbilstīgo skaitu bloku uztur kontrolētās temperatūrās 5–20 °C (± 1 °C) diapazonā vai nu ūdens vannās, vai nemainīgas temperatūras telpās. Ir vajadzīgi sūkņi, lai aerācijas traukos ievadītu testējamās ķīmiskās vielas šķīduma un nogulsnējušos dūņu devas vajadzīgajos ātrumos (attiecīgi 0–1 ml/min un 0–25 ml/min), kā arī trešais sūknis, lai no aerācijas traukiem izņemtu dūņu zudumus. Vajadzīgo dūņu zuduma plūsmas ļoti mazo ātrumu panāk, izmantojot sūkni, kas iestatīts ar lielāku ātrumu un ko, pateicoties taimerim, darbina periodiski, piemēram, darbinot to 10 sekundes minūtē, sūkņa padeves ātrums 3 ml/min apmērā nodrošina zuduma ātrumu 0,5 ml/min apmērā.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

13. Piemēro C.10.-A nodaļas 23. punktu.

Analītiskais aprīkojums

14. Piemēro C.10.-A nodaļas 24. punktu.

Ūdens

▼M4

15. Piemēro C.10.-A nodaļas 25. un 26. punktu.

Organiskā barotne

16. Piemēro C.10.-A nodaļas 27. punktu.

Sintētiskais notekūdens

17. Piemēro C.10.-A nodaļas 28. punktu.

Sadzīves notekūdens

18. Piemēro C.10.-A nodaļas 29. punktu.

Aktīvās dūņas

19. Piemēro C.10.-A nodaļas 30. punktu.

Testējamo ķīmisko vielu rezerves šķīdumi

20. Piemēro C.10.-A nodaļas 31. un 32. punktu.

PROCEDŪRA

Sējmateriāla sagatavošana

21. Piemēro tikai C.10.-A nodaļas 34. punktu. Jāizmanto aktīvās dūņas (apm. 2,5 g/l).

Testēšanas bloku skaits

22. Vienkārša testa gadījumā, t. i., lai izmērītu noārdīšanās īpatsvaru, ir vajadzīgs tikai viens *SRT*, bet, lai iegūtu datus, kas vajadzīgi nosacīto kinētikas konstanšu aprēķināšanai, it vajadzīgas 4 vai 5 *SRT* vērtības. Parasti izvēlas vērtības 2–10 dienu diapazonā. Praktiskā ziņā ir ērti veikt testēšanu ar 4 vai 5 *SRT* vienlaikus vienā temperatūrā. Plašākos pētījumos tās pašas *SRT* vērtības vai, iespējams, cita diapazona vērtības izmanto citās temperatūrās 5–20 °C diapazonā. Primārajai bionoārdīšanai (galvenais lietojums) parasti vajadzīgs tikai viens bloks katram apstākļu kopumam. Taču galīgās bionoārdīšanās testēšanai katram apstākļu kopumam vajadzīgs kontroles bloks, kas saņem notekūdeni, bet nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja uzskata, ka izmantotajā notekūdenī ir testējamā ķīmiskā viela, ir jāizmanto kontroles bloki, arī kad tiek novērtēta primāra bionoārdīšanās, un aprēķinos jāveic vajadzīgā korekcija.

Organiskās barotnes un testējamās ķīmiskās vielas dozēšana

23. Piemēro tikai C.10.-A nodaļas 36.–39. punktu, bet jāņem vērā, ka testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu dozē atsevišķi un ka izmanto dažādus dūņu zuduma ātrumus. Tāpat, ja vajadzīgs, ir jāuzrauga un jāpielāgo ± 10 % diapazonā ieplūdes un attīrīto notekūdeņu plūsmas ātrumi, kā arī dūņu zuduma regularitāte, piemēram, divreiz dienā. Ja, izmantojot sadzīves notekūdeni, analītiskajās metodēs rodas problēmas, testēšana jāveic ar sintētisko notekūdeni, bet ir jānodrošina, ka dažādās barotnes nodrošina salīdzināmus kinētikas datus.

Aktīvo dūņu bloku apstrāde

24. Piemēro C.10.-A nodaļas 40.–43. punktu, bet *SRT* ir jākontrolē tikai ar "nemainīgu" dūņu zudumu.

Paraugu ņemšana un analīze

25. Piemēro C.10.-A nodaļas 44.–50. punktu, izņemot to, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija un *DOC* nav jānosaka obligāti. *COD* nevajadzētu izmantot.

▼M4

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

26. Piemēro C.10.-A nodaļas 52.–54. punktu.

Testa rezultātu izteikšana

27. Piemēro C.10.-A nodaļas 56.–62. punktu.

Kinētikas konstanšu aprēķināšana

28. Reālāk ir norādīt vidējo stabila stāvokļa testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju attīrītajā notekūdenī un aprakstīt, kā tā mainās atkarībā no iekārtas darbības apstākļiem, nekā norādīt primārās bionoārdīšanās īpatsvaru. To var izdarīt, apsverot 6.2. papildinājuma 6. vienādojumu, kas var nodrošināt K_S, μ_m un θ_{SC} (kritiskais dūņu aiztures laiks) vērtības.

(K_S un μ_m aptuvenās vērtības var arī noteikt, izmantojot vienkāršu datorprogrammu, lai no 2. vienādojuma (6.2. papildinājums) aprēķināto teorētisko līkni piemērotu iegūtajām testēšanas vērtībām. Lai gan neviens šķīdums nebūs unikāls, var iegūt saprātīgu K_S un μ_m tuvinājumu.)

Rezultātu mainība

29. Parasti iegūst atsevišķu ķīmisko vielu kinētikas parametru mainīgās vērtības. Tiek uzskatīts, ka apstākļi, kādos dūņas ir augušas, kā arī testēšanas apstākļi (kā norādīts 5. punktā un citos testos) lielā mērā ietekmē rezultātu vērtības. Vienu no šīs mainības aspektiem ir aplūkojuši *Grady et al.* (4), kuri ir norādījuši, ka diviem galējiem apstākļiem jāizmanto termini "pastāvošs" un "raksturīgs", kas apraksta fizioloģiskā stāvokļa robežas, kuras kultūra var sasniegt kinētiska testa laikā. Ja testēšanas laikā stāvoklim neļauj mainīties, kinētisko parametru vērtības atspoguļo apstākļus vidē, no kuras mikroorganismi tika paņemti. Šīs vērtības sauc par "pastāvošām" jeb pašreiz esošām. Otras galējības gadījumā, ja testēšanas apstākļi pieļauj olbaltumvielu sintezējošas sistēmas pilnīgu attīstību, atļaujot maksimālo vairošanās ātrumu, iegūtos kinētikas parametrus sauc par "raksturīgiem" un tie ir atkarīgi no substrāta veida un baktēriju veidiem kultūrā. Proti, pastāvošās vērtības iegūs, saglabājot zemu substrāta koncentrācijas koeficientu attiecībā pret atbilstīgajiem mikroorganismiem (S_o/X_o), piemēram, 0,025, savukārt raksturīgās vērtības rodas, ja šis koeficients ir augsts, piemēram, vismaz 20. Abos gadījumos S_o jābūt vienādam ar attiecīgā puspiesātinājuma konstantes (Ks) vērtību vai jāpārsniedz tā.

30. Mainība un citi bionoārdīšanās kinētikas aspekti tika aplūkoti nesen notikušajā *SETAC* seminārā (5). Pateicoties šādiem pētījumiem, par kuriem ir sagatavoti pārskati, drīz vajadzētu iegūt skaidrāku priekšstatu par kinētiku saistībā ar notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, lai būtu iespējams labāk interpretēt esošos datus, kā arī ierosināt atbilstīgākas turpmākas testēšanas metodes.

LITERATŪRA:

(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**

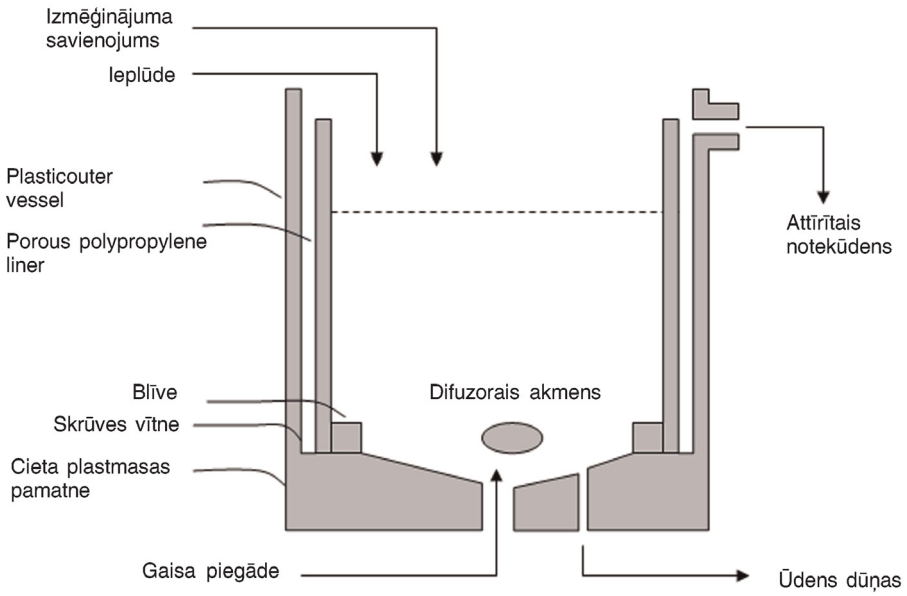
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(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

6.1. papildinājums

Porainais tīģelis ar SRT kontroli



▼M4

6.2. papildinājums

Kinētikas konstanšu aprēķināšana

1. Pieņemot, ka var piemērot *Monod* kinētiku, un ņemot vērā aktīvo cieto daļiņu un substrāta masas bilanci aktīvo dūņu sistēmā (1), var iegūt šādas stabila stāvokļa izteiksmes:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

vai

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kur:

S_1 = substrāta koncentrācija attīrītajā notekūdenī (mg/l);

K_S = puspiesātinājuma konstante, pie kuras koncentrācija: $\mu = \mu_m/2$ (mg/l);

μ = īpatnējais vairošanās ātrums (d^{-1});

μ_m = μ_m maksimālā vērtība (d^{-1});

K_d = aktīvo cieto daļiņu īpatnējais samazināšanās ātrums (d^{-1});

θ_S = vidējais dūņu aiztures laiks (*SRT*) (d).

Šā vienādojuma izpētes rezultātā var izdarīt šādus secinājumus:

i) koncentrācija attīrītajā notekūdenī ir atkarīga no koncentrācijas ieplūdē (S_0), tādējādi bionoārdīšanās īpatsvars mainās atkarībā no koncentrācijas ieplūdē (S_0);

ii) vienīgais iekārtas kontroles parametrs, kas ietekmē S_1, ir dūņu aiztures laiks (θ_S);

iii) katrai koncentrācijai ieplūdē (S_0) būs kritiskais dūņu aiztures laiks, proti:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kur:

θ_{SC} = kritiskais dūņu aiztures laiks, kuru nesasniedzot atbilstīgie mikroorganismi tiks izskaloti ārā no iekārtas;

iv) tā kā citi 2. vienādojuma parametri ir saistīti ar vairošanās kinētiku, temperatūra, visticamāk, ietekmēs substrāta līmeni attīrītajā notekūdenī un kritisko dūņu vecumu, t. i., dūņu aiztures laiks, kas vajadzīgs, lai iegūtu konkrētu attīrīšanas pakāpi, palielinātos, samazinoties temperatūrai.

2. No cieto daļiņu masas bilances porainā tīģeļa sistēmā un pieņemot, ka cieto daļiņu koncentrācija iekārtas attīrītajā notekūdenī (X_2) ir zema salīdzinājumā ar koncentrāciju aerācijas traukā (X_1), dūņu aiztures laiku var aprēķināt šādi:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

un

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kur:

V = aerācijas trauka tilpums (l);

X_1 = cieto daļiņu koncentrācija aerācijas traukā (mg/l);

X_2 = cieto daļiņu koncentrācija attīrītajā notekūdenī (mg/l);

Q_0 = ieplūdes plūsmas ātrums (l/d);

Q_1 = dūņu zuduma plūsmas ātrums (l/d).

Tādējādi ir iespējams kontrolēt dūņu aiztures laiku jebkurā iepriekš noteiktā vērtībā, kontrolējot dūņu zuduma plūsmas ātrumu (Q_1).

Secinājumi:

3. Tādējādi testēšanas galvenais mērķis ir nodrošināt koncentrācijas attīrītajā notekūdenī prognozējamību un attiecīgi arī testējamās ķīmiskās vielas līmeņu saņemošajos ūdeņos prognozējamību.

4. Grafiski attēlojot S_1 attiecībā pret θ_S, dažreiz var viegli novērtēt kritisko dūņu aiztures laiku (θ_{SC}), piemēram, 3. līkne 1. attēlā. Kad tas nav iespējams, θ_{SC} var aprēķināt kopā ar μ_m un K_S aptuvenām vērtībām, grafiski attēlojot S_1, attiecībā pret $S_1 \bullet \theta_S$.

1. vienādojuma pārgrupēšana nodrošina šādu rezultātu:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ja K_d ir mazs, tad $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ un (5) kļūst:

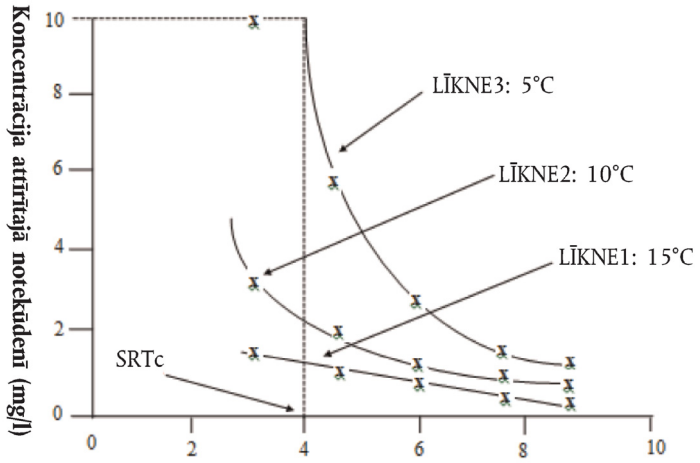
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Tādējādi grafiskajam attēlojumam jābūt taisnei (sk. 2. attēlu) ar $1/\mu_m$ slīpumu un jāšķērso K_S/μ_m; turklāt $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

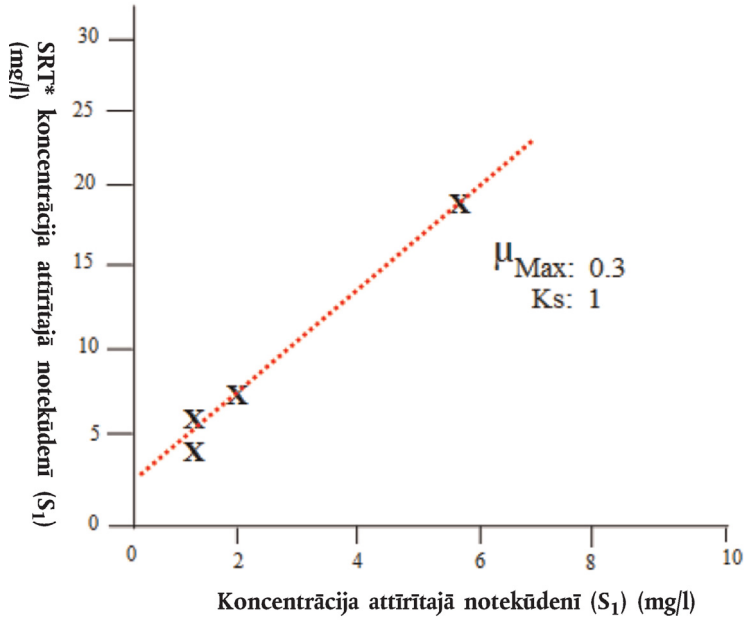
1. attēls

Trīs temperatūras, 5 *SRT*



2. attēls

Regresijas līnija *SRT* · S_1 attiecībā pret S_1 pie T = 5 °C



Glosārijs

Koncentrācija attīrītajā notekūdenī:

Līkne:

▼M4

7. papildinājums

TESTĒŠANA AR ZEMU (μg/l) KONCENTRĀCIJU DIAPAZONU

1. Ūdens vidē, pat notekūdeņos, parasti ir daudzas ķīmiskās vielas zemās koncentrācijās (μg/l). Šādās koncentrācijās tās, iespējams, nefunkcionē kā primāri substrāti, kas veicina vairošanos, bet, visticamāk, noārdās kā audzi neveidojoši, sekundāri substrāti kopā ar dažādām dabīgām oglekļa ķīmiskajām vielām. Tādēļ šādu ķīmisko vielu noārdīšanās nebūs piemērota 6. papildinājumā aprakstītajam modelim. Ir daudzi modeļi, ko varētu piemērot, un notekūdeņu attīrīšanas sistēmās pastāvošajos apstākļos vairāki no tiem varētu darboties vienlaikus. Ir vajadzīgs daudz vairāk pētījumu, lai izskaidrotu šo problēmu.

2. Teksta pamatdaļā (C.10.-A nodaļa) aprakstīto procedūru var izmantot tikai attiecībā uz primāro bionoārdīšanos, izmantojot zemas koncentrācijas (< 100 μg/l) un apstiprinātu analītisko procedūru. Bionoārdīšanās īpatsvaru var aprēķināt (sk. testēšanas metodes 54. punktu) ar nosacījumu, ka tiek ņemti vērā abiotiskie procesi (adsorbcija, gaistamība utt.). Kā piemēru var izmantot *Nyholm* un viņa kolēģu pētījumu (1) (2), kurā izmantoja 4 h ciklu uzpildīšanas un noliešanas sistēmā. Šie pētnieki konstatēja pseido pirmās kārtas konstantes piecām ķīmiskajām vielām, ko pievienoja sintētiskajam notekūdenim 5–100 μg/l apmērā. Lai panāktu galīgu bionoārdīšanos, var izmantot ^{14}C-marķētas testējamās ķīmiskās vielas. Šādas pieejas apraksts neietilpst šīs testēšanas metodes darbības jomā, jo vēl nav panākta vienošanās par procedūrām, lai gan ISO 14592 (3) vajadzībām ierosinātā metodē ir ietverti norādījumi par ^{14}C marķētu ķīmisko vielu izmantošanu.

***SCAS* testēšana**

3. Vēlākā posmā tika ierosināts vienkāršāks divu posmu tests (4) (5) (6). Pēc daļēji nepārtrauktās aktīvo dūņu (turpmāk – *SCAS*) metodes veic īstermiņa kinētikas testēšanu ar paraugiem, kas ņemti no *SCAS* blokiem. *SCAS* sistēmu darbina ar zināmiem dūņu zuduma ātrumiem (pretēji sākotnējai testēšanas metodei C.12) un tajā iepilda modificētu ESAO sintētisko notekūdeni vai sadzīves notekūdeni. Sintētisko ūdeni modificēja (pH vērtības mainīšanās un vājas dūņu nogulsnēšanās spējas dēļ), pievienojot fosfātu kā buferšķīdumu, rauga ekstraktu, dzelzs (III) hlorīdu un mikroelementu sāļus, un tā *COD* paaugstināja aptuveni līdz 750 mg/l, palielinot peptona un gaļas ekstrakta koncentrāciju. Blokus darbināja 24 h ciklā: aerācija 23 h, dūņu zudums, nogulsnēšanās, dzidrā šķīduma (attīrītā notekūdens) noņemšana, pēc kuras pievienot sintētisko notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu līdz 100 μg/l (t. i., aptuveni tāda pati koncentrācija, kādu izmanto īstermiņa testēšanā). Reizi nedēļā 10 % no kopējā dūņu daudzuma aizvieto ar svaigām dūņām, lai saglabātu līdzsvarotu mikrobu populāciju.

4. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas izmēra sākumā un aerācijas beigās un testēšanu turpina, līdz sasniedz testējamās ķīmiskās vielas pastāvīgu noārdīšanos. Tas var aizņemt laiku no vienas nedēļas līdz vairākiem mēnešiem.

Īstermiņa testēšana

5. Īstermiņa testēšanu (piemēram, 8 h) veic, lai noteiktu (pseido) pirmās kārtas kinētiskā koeficienta konstanti testējamās ķīmiskās vielas samazinājumam aktīvajās dūņās, kas nāk no zināmiem, bet atšķirīgiem avotiem un lietojumiem. It sevišķi dūņu paraugus ņem no *SCAS* reaktoriem – aerācijas perioda beigās, kad organiskā substrāta koncentrācija ir zema, – aklimatizācijas testēšanas gaitā (3. un 4. punkts). Dūņas var ņemt arī no paralēla *SCAS* bloka, kam

▼M4

nepievieno testējamo ķīmisko vielu, lai veiktu salīdzinājumu. Dūņu un testējamās ķīmiskās vielas, ko pievieno divās vai vairākās koncentrācijās 1–50 μg/l diapazonā, maisījumiem veic aerāciju, nepievienojot sintētisko notekūdeni vai organisko substrātu. Šķīdumā saglabāto testējamo ķīmisko vielu nosaka regulāros intervālos, piemēram, reizi stundā, atkarībā no ķīmiskās vielas noārdīšanas spējas un ne ilgāk kā 24 stundu periodā. Pirms atbilstīgas analīzes veikšanas paraugus centrifugē.

Aprēķini

6. Datus no *SCAS* blokiem izmanto, lai aprēķinātu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvaru (54. punkts). Tāpat var aprēķināt vidējo koeficienta konstanti (K_1) (kas normalizēta suspendēto cieto daļiņu koncentrācijai) ar vienādojumu:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kur:

t = aerācijas laiks (23 h);

C_e = koncentrācija aerācijas perioda beigās (μg/l);

C_i = koncentrācija aerācijas sākumā (μg/l);

SS = aktīvo dūņu cieto daļiņu koncentrācija (g/l).

7. Īstermiņa testēšanā palikusī log % koncentrācija tiek grafiski attēlota attiecībā pret laiku, un grafiskā attēlojuma sākotnējās daļas slīpums (10–50 % noārdīšanās) atbilst K_1 (pseido) pirmās kārtas konstantei. Konstanti normalizē attiecībā uz dūņu cieto daļiņu koncentrāciju, dalot slīpumu ar dūņu cieto daļiņu koncentrāciju. Pārskatā norādītajam rezultātam ir jāietver arī dati par testējamās ķīmiskās vielas un suspendēto cieto daļiņu sākuma koncentrācijām, dūņu aiztures laiku, dūņu pievienošanu un avotu, kā arī par iepriekšēju pakļaušanu testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai (ja tāda bijusi).

Rezultātu mainība

8. Mainība un citi bionoārdīšanās kinētikas aspekti tika aplūkoti nesen notikušajā *SETAC* seminārā (7). Pateicoties šādiem pētījumiem, par kuriem ir sagatavoti pārskati, drīz vajadzētu iegūt skaidrāku priekšstatu par kinētiku saistībā ar notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, lai būtu iespējams labāk interpretēt esošos datus, kā arī ierosināt atbilstīgākas turpmākas testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(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. Bioplēves

IEVADS

1. Imitācijas testēšanu parasti veic ar ķīmiskajām vielām, kas nav sekmīgi noārdījušās vieglās bionoārdīšanās skrīninga testā (šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļa (9)), bet ir noārdījušās potenciālās bionoārdīšanās testā. Izņēmuma kārtā imitācijas testēšanu veic arī ar ķīmiskajām vielām, par kurām vajadzīga papildu informācija, it sevišķi ar tādām, ko izstrādā daudzu tonnu apmērā, un parasti piemēro aktīvo dūņu testu (C.10.-A nodaļa). Tomēr dažās situācijās ir vajadzīga konkrēta informācija par ķīmiskās vielas reakciju uz notekūdeņu attīrīšanas metodēm, kuras ietver bioplēves, proti, perkolēšanas vai pilināšanas filtriem, rotējošajiem bioloģiskajiem kontaktoriem un virstošajiem slāņiem. Lai nodrošinātu šo vajadzību, ir izstrādātas dažādas iekārtas.

2. *Gerike et al*. (1) izmantoja lielus pilināšanas pilotfiltrus, ko darbināja savienoto bloku režīmā. Šiem filtriem bija vajadzīga plaša telpa un samērā liels daudzums notekūdeņu vai sintētisko notekūdeņu. *Truesdale et al*. (2) aprakstīja mazākus filtrus (diametrs 6 pēdas × 6 collas), kuros iepildīja dabīgu notekūdeni bez virsmaktīvajām vielām, bet tiem vienalga bija vajadzīgi lieli daudzumi. "Nobriedušas" bioplēves izveidei bija vajadzīgas 14 nedēļas, turklāt papildu 4–8 nedēļas bija vajadzīgas aklimatizācijai pēc testējamās virsmaktīvās vielas pirmās pievienošanas.

3. *Baumann et al.* (3) izstrādāja daudz mazāku filtru, kurā izmantoja poliestera "šķiedru", kas iepriekš bija iemērkta aktīvajās dūņās kā inertā barotnē, kura veicina bioplēves veidošanos. Testējamo ķīmisko vielu izmantoja kā vienīgo oglekļa avotu un bionoārdīšanos novērtēja no izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – *DOC*) mērījumiem ieplūdē un attīrītajā notekūdenī, kā arī no CO_2 daudzuma izejas gāzē.

4. *Gloyna et al.* (4) izvēlējās samērā atšķirīgu pieeju un izgudroja rotējošu cilindrisku reaktoru. Uz rotējošās caurules iekšējās virsmas izaudzēja bioplēvi uz zināmās virsmas platības, no caurules, kas izvietota slīpi nelielā leņķī attiecībā pret horizontāli, augšpuses ieplūdinot ieplūdes strūklu. Reaktoru izmanto, lai izpētītu virsmaktīvo vielu bionoārdīšanos (5), kā arī bioplēves optimālo biezumu un difūziju cauri plēvei (6). Šie pēdējie minētie autori izstrādāja reaktoru, kā arī pielāgoja to, lai būtu iespējams noteikt CO_2 izejas gāzē.

5. Analītiķu pastāvīgā komiteja (AK) šo rotējošo cilindrisko reaktoru ir pieņēmusi par standarta metodi, ar kuras palīdzību var novērtēt gan ķīmisko vielu bionoārdīšanos (7), gan notekūdeņu toksicitātes attīrāmību (8). Šeit aprakstītās metodes priekšrocības ir vienkāršība, kompaktums, atkārtojamība un samērā mazie vajadzīgie organiskās barotnes daudzumi.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

6. Sintētisko vai sadzīves notekūdeni un testējamo ķīmisko vielu – maisījumā vai vienu pašu – ieplūdina uz lēni rotējošas, slīpi izvietotas caurules iekšējās virsmas. Uz iekšējās virsmas veidojas mikroorganismu slānis, kas līdzīgs biofiltra barotnē esošajam. Reaktora darbības apstākļus izvēlas tā, lai nodrošinātu pietiekamu organiskās vielas noārdīšanos un, ja vajadzīgs, amonija oksidāciju.

▼M4

7. Attīrīto notekūdeni no caurules savāc un tam vai nu ļauj nogulsnēties, un/vai to filtrē pirms *DOC* un/vai testējamās ķīmiskās vielas analizēšanas ar īpašu metodi. Paralēli tādos pašos apstākļos tiek darbināti kontroles bloki, lai būtu iespējams salīdzinājums. Pieņem, ka starpība starp *DOC* koncentrācijām attīrītajā notekūdenī testēšanas blokā un kontroles blokā ir attiecināma uz testējamo ķīmisko vielu un tās organiskajiem metabolītiem. Šo starpību salīdzina ar pievienotās testējamās ķīmiskās vielas (kā *DOC*) koncentrāciju, lai aprēķinātu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanos.

8. Bionoārdīšanos parasti var nošķirt no bioadsorbcijas, rūpīgi izpētot noārdīšanās un laika līkni. Apstiprinājumu parasti var iegūt, veicot vieglas bionoārdīšanās testu (skābekļa uzņemšana vai oglekļa dioksīda veidošanās), izmantojot aklimatizētu sējmateriālu, kas testa beigās paņemts no reaktoriem, kuri saņem testējamo ķīmisko vielu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

9. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas tīrībai, šķīdībai ūdenī, gaistamībai un adsorbcijas īpašībām, lai būtu iespējams pareizi interpretēt iegūstamos rezultātus.

10. Parasti gaistošas un mazšķīstošas ķīmiskās vielas nevar testēt, ja vien netiek īstenoti īpaši piesardzības pasākumi (sk. C.10.-A nodaļas 5. papildinājumu). Jābūt zināmai arī ķīmiskajai struktūrai vai vismaz empīriskajai formulai, lai būtu iespējams aprēķināt teorētiskās vērtības un/vai pārbaudīt parametru noteiktās vērtības, piemēram, teorētisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *ThOD*) un *DOC*.

11. Piemērotāko testēšanas koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksisko iedarbību uz mikroorganismiem (sk. C.10.-A nodaļas 4. papildinājumu), kas var būt svarīga bionoārdīšanās spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

12. Sākotnēji virsmaktīvo vielu primārās bionoārdīšanās līmenim bija jābūt 80 % un augstākam, pirms ķīmisko vielu varēja laist tirgū. Ja netiek sasniegts 80 % līmenis, var veikt šo imitācijas (apstiprināšanas) testu un virsmaktīvo vielu var laist tirgū tikai tad, ja vairāk nekā 90 % no konkrētās ķīmiskās vielas ir noārdīti. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām parasti nav šaubu par sekmīgu vai nesekmīgu testēšanas rezultātu, un iegūto noārdīšanas īpatsvara vērtību var izmanot, lai aptuveni aprēķinātu iespējamo koncentrāciju vidē, ko var izmantot ķīmisko vielu radītā apdraudējuma novērtēšanā. Vairākos pētījumos ar tīrām ķīmiskām vielām atklātais *DOC* noārdīšanās īpatsvars bija > 90 % vairāk nekā trīs ceturtdaļās gadījumu un > 80 % no vairāk nekā 90 % ķīmisko vielu, kas uzrādīja jebkādu būtisku bionoārdīšanās pakāpi.

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

13. Lai nodrošinātu testa procedūras pareizu īstenošanu, dažreiz ir lietderīgi testēt ķīmiskās standartvielas, kuru reakcija ir zināma. Šādas ķīmiskās vielas ietver adipīnskābi, 2-fenilfenolu, 1-naftolu, difēnskābi un 1-naftālskābi.

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

14. Kādā AK laboratorijā konstatēja, ka relatīvā standartnovirze testa ietvaros ir 3,5 % un starp testiem – 5 % (7).

▼M4

METODES APRAKSTS

Iekārta

Rotējošs cilindrisks reaktors

15. Iekārta (sk. 8. papildinājuma 1. un 2. attēlu) sastāv no vairākām akrila caurulēm, kas katra ir 30,5 cm gara ar 5 cm iekšējo diametru un balstās uz gumijas riteņiem, kuri ievietoti metāla balstrāmī. Katrai caurulei ir ārējā lūpa, aptuveni 0,5 cm dziļa, lai tā noturētos uz riteņiem. Iekšējā virsma ir padarīta nelīdzena ar rupjas struktūras drāšu sūkli, un augšgalā (kur notiek ieplūde) atrodas 0,5 cm dziļa iekšējā lūpa, lai ierobežotu šķidrumu. Caurules ir novietotas slīpi, aptuveni 1 grāda leņķī attiecībā pret horizontāli, lai panāktu vajadzīgo saskarsmes laiku, kad testa barotni ieplūdina tīrā caurulē. Gumijas riteņus rotē, izmantojot lēnu, dažādu ātrumu motoru. Cauruļu temperatūru kontrolē, tās uzstādot nemainīgas temperatūras telpā.

16. Katru cauruļu reaktoru ievietojot nedaudz lielākā, slēgtā caurulē un nodrošinot, ka savienojumi ir gāzes necaurlaidīgi, ir iespējams savākt izejas CO_2 gāzi alkalīna šķīdumā, lai izdarītu turpmākus mērījumus (6).

17. Divdesmit litru glabāšanas traukā (A) (sk. 2. attēlu) glabā katras caurules organiskās barotnes 24 h vajadzīgo daudzumu, ja vajadzīgs, kopā ar pievienotu testējamo ķīmisko vielu. Ja vajadzīgs, testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu var dozēt atsevišķi. Netālu no katra glabāšanas trauka apakšas ir atvere, kas ar piemērotām caurulēm, piemēram, silikona gumijas caurulēm, un ar peristaltisko sūkni (B) ir savienota ar akrila piegādes cauruli, kura iestiepjas 2–4 cm slīpi izvietotās caurules (C) augšgalā (kur notiek ieplūde). Attīrītajam notekūdenim ļauj pilēt no slīpi izvietotās caurules apakšgala un to savāc citā glabāšanas traukā (D). Attīrītajam notekūdenim ļauj nogulsnēties vai to filtrē pirms analīzes veikšanas.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

18. Iekārta paraugu filtrēšanai ar membrānas filtriem, kam ir pietiekama porainība (nominālais atvērumu diametrs ir 0,45 μm) un kas adsorbē organiskās ķīmiskās vielas vai nelielā mērā laiž cauri organisko oglekli. Ja tiek izmantoti filtri, kas organisko oglekli neaiztur, tie ir rūpīgi jānomazgā ar karstu ūdeni, lai nomazgātu noskalojamo organisko oglekli. Var izmantot arī centrifūgu, kas spēj nodrošināt ātrumu 40 000 m/s^2.

19. Analītiskais aprīkojums, lai noteiktu:

— *DOC* / kopējo organisko oglekli (turpmāk – *TOC*) vai ķīmisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *COD*),

— konkrētu ķīmisko vielu (*HPLC*, *GC* utt.), ja vajadzīgs,

— pH, temperatūru, skābumu un sārmainību,

— amoniju, nitrītu un nitrātu, ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos.

Ūdens

20. Krāna ūdens, kurā *DOC* nepārsniedz 3 mg/l.

21. Destilēts vai dejonizēts ūdens, kurā *DOC* nepārsniedz 2 mg/l.

▼M4

Organiskā barotne

22. Par organisko barotni var izmantot sintētisko notekūdeni, sadzīves notekūdeni vai abu maisījumu. Ir pierādīts, ka, ja tiek izmantots tikai sadzīves notekūdens, nereti var tikt uzrādīts lielāks *DOC* noārdīšanās īpatsvars (aktīvo dūņu blokos) un pat pieļauta dažu tādu ķīmisko vielu bionoārdīšanās, kuras bioloģiski nenoārdās, izmantojot ESAO sintētisko notekūdeni. Tādējādi ir ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni. *DOC* (vai *COD*) koncentrācija ir jānosaka katrā jaunā organiskās barotnes partijā. Organiskās barotnes skābumam un sārmainībai ir jābūt zināmai. Barotnei var būt nepieciešams pievienot piemērotu buferšķīdumu (nātrija hidrogēnkarbonātu vai kālija hidrogēnfosfātu), ja tai ir zems skābums vai sārmainība, lai testēšanas laikā reaktorā pH uzturētu aptuveni 7,5 ± 0,5 robežās. Lēmums par buferšķīduma tilpumu un pievienošanas laiku jāpieņem katrā gadījumā atsevišķi.

Sintētiskais notekūdens

23. Jāšķīdina katrā litrā krāna ūdens: 160 mg peptona, 110 mg gaļas ekstrakta, 30 mg urīnvielas, 28 mg bezūdens dikālija hidrogēnfosfāta (K_2HPO_4), 7 mg nātrija hlorīda (NaCl), 4 mg kalcija hlorīda dihidrāta ($CaCl_2.2H_2O$) un 2 mg magnija sulfāta heptahidrāta ($MgSO_4.7H_2O$). Šis ESAO sintētiskais notekūdens ir piemērs un paredz vidējo *DOC* koncentrāciju ieplūdē aptuveni 100 mg/l apmērā. Var izmantot arī citus savienojumus ar apmēram tādām pašām *DOC* koncentrācijām, kas tuvāk atspoguļo faktisko notekūdeni. Šo sintētisko notekūdeni var izstrādāt destilētā ūdenī koncentrētā veidā un glabāt aptuveni 1 °C temperatūrā līdz pat vienai nedēļai. Kad vajadzīgs, jāatšķaida ar krāna ūdeni. (Šī barotne ir neapmierinoša, jo to raksturo, piemēram, ļoti augsta slāpekļa koncentrācija, samērā zems oglekļa saturs, bet nekas labāks nav atklāts, izņemot ieteikumu pievienot vairāk fosfātu kā buferšķīdumu un papildu peptonu).

Sadzīves notekūdens

24. Jāizmanto svaigs, nogulsnējies notekūdens, kas iegūts ikdienas attīrīšanas darbos, kuros galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni. Tas jāsavāc no primārās nosēdtvertnes pārplūdes kanāla vai no barotnes aktīvo dūņu iekārtai, un tam lielākoties jābūt bez rupjām daļiņām. Notekūdeni var izmantot pēc vairāku dienu glabāšanas aptuveni 4 °C, ja tiek nodrošināts, ka glabāšanas laikā būtiski nesamazinās *DOC* (vai *COD*) (t. i., mazāk kā par 20 %). Lai ierobežotu sistēmas traucējumus, pirms izmantošanas katras jaunas partijas *DOC* (vai *COD*) ir jāpielāgo atbilstīgai nemainīgai vērtībai, piemēram, atšķaidot ar krāna ūdeni.

Smērviela

25. Peristaltiskā sūkņa skrituļu eļļošanai var izmantot glicerīnu vai olīveļļu. Abi ir piemēroti izmantošanai uz silikona gumijas caurulēm.

Testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdumi

26. Ķīmiskajām vielām ar pietiekamu šķīdību jāsagatavo rezerves šķīdumi dejonizētā ūdenī vai sintētiskā notekūdens minerālbarotnē, nodrošinot atbilstīgas koncentrācijas (piemēram, 1–5 g/l). Attiecībā uz nešķīstošām ķīmiskajām vielām sk. C.10.-A nodaļas 5. papildinājumu. Šī metode nav piemērota gaistošām ķīmiskajām vielām, ja vien netiek pielāgoti cilindriskie reaktori (16. punkts). Jānosaka rezerves šķīduma *DOC* un *TOC*, un mērījumi jāatkārto katrai jaunai partijai. Ja atšķirība starp *DOC* un *TOC* pārsniedz 20 %, jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas šķīdība ūdenī. Jāsalīdzina *DOC* vai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, mērījumus izdarot ar rezerves šķīduma

▼M4

īpašu analīzi, ar nominālo vērtību, lai noskaidrotu, vai atgūšana ir pietiekami laba (parasti var paredzēt > 90 %). Jānoskaidro, it sevišķi attiecībā uz dispersijām, vai *DOC* var vai nevar izmantot kā analītisku parametru vai arī var izmantot vienīgi kā analītisku paņēmienu, kas piemērots konkrētajai testējamai ķīmiskajai vielai. Dispersijām ir vajadzīga paraugu centrifugēšana. Katrā jaunā partijā ir jānosaka *DOC*, *COD* vai testējamā ķīmiskā viela, veicot īpašu analīzi.

27. Jānosaka rezerves šķīduma pH. Galējas vērtības norāda, ka ķīmiskās vielas pievienošana, iespējams, ietekmē aktīvo dūņu pH testēšanas sistēmā. Tādā gadījumā rezerves šķīdums ir jāneitralizē, lai iegūtu pH 7 ± 0,5 apmērā, izmantojot nedaudz neorganiskās skābes vai bāzes, bet izvairoties no testējamās ķīmiskās vielas nogulsnēšanās.

PROCEDŪRA

Organiskās barotnes sagatavošana dozēšanai

28. Jānodrošina, ka gan testēšanas sākumā, gan tās laikā visas ieplūdes un attīrītā notekūdens tvertnes, kā arī caurules no ieplūdes tvertnēm un uz attīrītā notekūdens tvertnēm tiek rūpīgi iztīrītas, lai nomazgātu mikrobu kolonijas.

29. Katru dienu ir jāsagatavo svaigs sintētiskais notekūdens (23. punkts) vai nu no cietajām daļiņām, vai no koncentrētā rezerves šķīduma, to atbilstīgi atšķaidot ar krāna ūdeni. Vajadzīgais daudzums jānomēra mērcilindrā un jāiepilda tīrā ieplūdes traukā. Tāpat, ja vajadzīgs, sintētiskajam notekūdenim pirms atšķaidīšanas jāpievieno testējamās ķīmiskās vielas vai ķīmiskās standartvielas rezerves šķīduma vajadzīgais daudzums. Ja tā ir ērtāk vai ja tas vajadzīgs, lai izvairītos no testējamās ķīmiskās vielas zudumiem, jāsagatavo atsevišķs testējamās ķīmiskās vielas atšķaidīts šķīdums atsevišķā rezervuārā un tas jāieplūdina slīpi izvietotajās caurulēs ar citu dozētājsūkni.

30. Var arī (un ir vēlams) izmantot nogulsnējušos sadzīves notekūdeni (24. punkts), ko katru dienu savāc svaigu, ja iespējams.

Rotējošo cilindrisko reaktoru darbināšana

31. Lai novērtētu vienu testējamo ķīmisko vielu, ir vajadzīgi divi identiski cilindriskie reaktori, ko montē nemainīgas temperatūras telpā, parasti 22 ± 2 °C.

32. Jāpielāgo peristaltiskie sūkņi, lai tie slīpi izvietotajās caurulēs, ko rotē ar ātrumu 18 ± 2 rpm, piegādātu organisko barotni (bez testējamās ķīmiskās vielas) 250 ± 25 ml/h apmērā. Sākumā un pēc tam periodiski testēšanas laikā uz sūkņa caurulēm aplicē smērvielu (25. punkts), lai nodrošinātu atbilstīgu darbību un pagarinātu cauruļu darbmūžu.

33. Jāpielāgo cauruļu slīpuma leņķis attiecībā pret horizontāli, lai nodrošinātu barotnes uzturēšanās laiku 125 ± 12,5 s apmērā tīrā caurulē. Ir jāaplēš aiztures laiks, barotnei pievienojot nebioloģisku marķieri (piemēram, NaCl, inertu krāsvielu): laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu maksimālo koncentrāciju attīrītajā notekūdenī, uzskata par vidējo aiztures laiku (ja ir izveidojusies maksimālā plēve, aiztures laiks var palielināties līdz aptuveni 30 minūtēm).

34. Ir konstatēts, ka šie koeficienti, ātrumi un laiki nodrošina *DOC* (vai *COD*) atbilstīgu noārdīšanos (> 80 %) un nitrificētus attīrītos notekūdeņus. Ir jāizmaina plūsmas ātrums, ja noārdīšanās ir nepietiekama vai ja ir jāimitē konkrētas attīrīšanas iekārtas veiktspēja. Ja ir jāimitē konkrētas attīrīšanas iekārtas veiktspēja, ir jāpielāgo organiskās barotnes dozēšana, līdz reaktora veiktspēja atbilst attīrīšanas iekārtas veiktspējai.

▼M4

Sējmateriāls

35. Gaisā pārnēsāts sējmateriāls var būt pietiekams, lai izraisītu mikroorganismu augšanu, ja izmanto sintētisko notekūdeni. Pretējā gadījumā barotnei trīs dienas jāpievieno 1 ml/l nogulsnējuša notekūdens.

Mērījumi

36. Regulāros intervālos ir jāpārliecinās, ka devas un rotēšanas ātrumi ir vajadzīgajās robežās. Tāpat jāizmēra attīrītā notekūdens pH, it sevišķi, ja paredzama nitrificēšanās.

Paraugu ņemšana un analīze

37. Paraugu ņemšanas metodi, pieeju un regularitāti izvēlas atbilstīgi testēšanas mērķim. Piemēram, var ņemt ieplūdes un attīrītā notekūdens ātros paraugus vai savākt paraugus ilgākā laikposmā, piemēram, 3–6 h. Sākumā, kad nav pievienota testējamā ķīmiskā viela, paraugi jāņem divreiz nedēļā. Paraugi jāfiltrē cauri membrānām vai jācentrifugē aptuveni 40 000 m/s^2 ātrumā apmēram 15 minūtes (18. punkts). Pirms filtrēšanas cauri membrānai var būt nepieciešams paraugiem ļaut nogulsnēties un/vai tos filtrēt cauri filtram ar rupjām porām. *DOC* (vai *COD*) ir jānosaka vismaz divreiz un, ja vajadzīgs, jānosaka arī *BOD*, amonijs un nitrīts/nitrāts.

38. Visas analīzes jāveic pēc iespējas ātrāk pēc paraugu savākšanas un sagatavošanas. Ja analīzes ir jāatliek, paraugi ir jāglabā pilnās, cieši aizvākotās pudelēs 4 °C un tumsā. Ja paraugi ir jāglabā ilgāk par 48 h, tie jāuzglabā saldēti, ar paskābināšanu vai pievienojot piemērotu toksisku vielu (piemēram, 20 ml/l no 10 g/l dzīvsudraba (II) hlorīda šķīduma). Ir jānodrošina, ka uzglabāšanas paņēmiens neietekmē analīzes rezultātus.

Piesātrādes laiks

39. Šajā laikposmā virsmas bioplēve aug, lai sasniegtu optimālo biezumu, un parasti tas aizņem aptuveni divas nedēļas. Šim laikam nevajadzētu pārsniegt sešas nedēļas. *DOC* (vai *COD*) noārdīšanās (44. punkts) palielinās un sasniedz plato vērtību. Kad plato ir sasniegts līdzīgā vērtībā abās caurulēs, vienu izvēlas par kontroles cauruli testa atlikušajai daļai, kuras laikā šo cauruļu veiktspējai jāsaglabājas konsekventai.

Testējamās ķīmiskās vielas pievienošana

40. Šajā posmā otrā reaktorā ir jāpievieno testējamā ķīmiskā viela vajadzīgajā koncentrācijā, parasti 10–20 mg C/l. Kontroles caurule turpina saņemt tikai organisko barotni.

Aklimatizācijas periods

41. Ir jāturpina *DOC* (vai *COD*) analīžu veikšana divreiz nedēļā, un, ja ir jānovērtē primārās bionoārdīšanās spēja, ar īpašu analīzi jānosaka arī testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija. Pēc testējamās ķīmiskās vielas pirmās pievienošanas jānogaida 1–6 nedēļas (vai ilgāk, ja pastāv īpaši apstākļi), lai sāktos aklimatizācija. Kad noārdīšanās īpatsvars (43.–45. punkts) sasniedz maksimālo vērtību, jāiegūst 12–15 derīgas vērtības plato fāzē aptuveni triju nedēļu laikā, lai novērtētu vidējo noārdīšanās īpatsvaru. Testu uzskata par pabeigtu, ja ir sasniegta pietiekami augsta noārdīšanās pakāpe. Parasti testēšanas ilgums nedrīkstētu pārsniegt 12 nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pirmās pievienošanas.

▼M4

Plēves nomešana

42. Nevajadzīgās plēves pēkšņa noārdīšanās vai nomešana no caurulēm notiek samērā regulāros intervālos. Lai nodrošinātu, ka netiek skarta rezultātu salīdzināmība, testēšanā jāļauj ietvert vismaz divi pilni augšanas un nomešanas cikli.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

43. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvars katrā plānotajā novērtējumā, izmantojot šādu vienādojumu:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

kur:

D_t = *DOC* (vai *COD*) noārdīšanās īpatsvars laikā t;

Cs = *DOC* (vai *COD*) koncentrācija ieplūdē testējamās ķīmiskās vielas dēļ, ko ieteicams aplēst no koncentrācijas rezerves šķīdumā un no tā pievienotā daudzuma (mg/l);

E = izmērītā *DOC* (vai *COD*) vērtība testēšanas reaktora attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l);

Eo = izmērītā *DOC* (vai *COD*) vērtība kontroles reaktora attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l).

Ja tiek testēta ķīmiskā standartviela, aprēķins jāatkārto arī ar to.

Kontroles reaktora veiktspēja

44. Organiskās barotnes *DOC* (vai *COD*) noārdīšanās (D_B) kontroles reaktoros ir lietderīga informācija, lai novērtētu bioplēves bionoārdīšanās aktivitāti testēšanas laikā. Noārdīšanās īpatsvars ir jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

kur:

C_m = organiskās barotnes *DOC* (vai *COD*) kontroles ieplūdē (mg/l).

45. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās (D_{ST}), ja tā ir izmērīta, ar konkrētu analītisko metodi katra plānotā novērtējuma laikā pēc vienādojuma:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

kur:

Si = izmērītā vai, vēlams, aplēstā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē (mg/l);

Se = izmērītā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas attīrītajā notekūdenī (mg/l).

▼M4

Ja analītiskā metode sniedz pozitīvu vērtību nemainītā notekūdens ekvivalentā S_c mg/l, noārdīšanās īpatsvars (D_{SC}) jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Testēšanas rezultātu izteikšana

46. Ir grafiski jāattēlo noārdīšanās īpatsvars D_t un D_{ST} (vai D_{SC}), ja pieejams, attiecībā pret laiku (sk. C.10.-A nodaļas 2. papildinājumu). Par testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvaru uzskata plato fāzē iegūto 12–15 D_T (un D_{ST}, ja pieejams) vērtību vidējo novirzi (kas izteikta tuvākajā veselajā skaitlī) un standartnovirzi. No noārdīšanās līknes formas var izdarīt dažus secinājumus par noārdīšanas procesiem.

Adsorbcija

47. Ja ir novērota testējamās ķīmiskās vielas *DOC* būtiska noārdīšanās testēšanas sākumā, testējamā ķīmiskā viela, iespējams, tiek noārdīta ar adsorbciju uz bioplēves. Var būt iespējams to pierādīt, nosakot adsorbēto testējamo ķīmisko vielu uz cietajām daļiņām, kas nomestas no plēves. Parasti adsorbējamu ķīmisko vielu *DOC* noārdīšanās pakāpe nesaglabājas augsta visā testēšanas laikā, proti, parasti noārdīšanās pakāpe ir augsta sākumā un pēc tam tā pakāpeniski samazinās līdz līdzsvara vērtībai. Ja tomēr adsorbētā testējamā ķīmiskā viela spēja izraisīt mikrobu populācijas aklimatizāciju, testējamās ķīmiskās vielas *DOC* noārdīšanās pēc tam pieaugtu un sasniegtu augstu plato līmeni.

Kavējuma fāze

48. Tāpat kā statiskajos, arī skrīninga testos daudzām testējamām ķīmiskajām vielām ir vajadzīga kavējuma fāze, pirms notiek pilnīga bionoārdīšanās. Kavējuma fāzē atbilstīgo baktēriju aklimatizācija (vai pielāgošanās) notiek, testējamai ķīmiskajai vielai gandrīz nemaz nenoārdoties, savukārt tad sākas šo baktēriju vairošanās. Ir pieņemts, ka šī fāze beidzas un noārdīšanās fāze sākas brīdī, kad ir noārdījušies aptuveni 10 % no testējamās ķīmiskās vielas sākotnējā daudzuma (pēc adsorbcijas, ja tāda notiek). Kavējuma fāze nereti ir ļoti mainīgs rādītājs, kam ir slikta atkārtojamība.

Plato fāze

49. Nepārtrauktā testēšanā noārdīšanās līknes plato fāzi definē kā fāzi, kurā notiek vislielākā noārdīšanās. Šai fāzei jāilgst vismaz trīs nedēļas un jābūt aptuveni 12–15 izmērītām derīgām vērtībām.

Testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vidējā pakāpe

50. Jāaprēķina vidējā vērtība no testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vērtībām D_t (un D_{st}, ja pieejams) plato fāzē. Noapaļojot to līdz tuvākajam veselajam skaitlim (1 %), iegūst testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi. Ieteicams arī aprēķināt vidējās vērtības 95 % ticamības intervālu. Līdzīgi ir jāaprēķina organiskās barotnes noārdīšanās vidējā pakāpe (D_B) kontroles traukā.

▼M4

Norādes par bionoārdīšanos

51. Ja testējamā ķīmiskā viela būtiski neadsorbējas uz bioplēves un ja noārdīšanās līknei ir tipiska bionoārdīšanās līknes forma ar kavējuma, noārdīšanās un plato fāzēm (48. un 49. punkts), izmērīto noārdīšanos var droši attiecināt uz bionoārdīšanos. Ja sākumā ir novērota augsta noārdīšanās pakāpe, imitācijas testēšanā nevar nošķirt bioloģiskos un abiotiskos noārdīšanās procesus. Šādos gadījumos un gadījumos, kad pastāv šaubas par bionoārdīšanos (piemēram, ja notiek atdalīšanās), ir jāanalizē adsorbētā testējamā ķīmiskā viela uz plēves paraugiem vai jāveic papildu statiskie (skrīninga) bionoārdīšanās spējas testi, pamatojoties uz parametriem, kas skaidri uzrāda bioloģiskus procesus. Šādi testi ietver skābekļa uzņemšanas metodes (šā pielikuma C.4.-D, C.4.-E un C.4.-F nodaļa) (9) vai testu ar CO_2 veidošanās mērīšanu (šā pielikuma C.4.-C nodaļa vai brīvā tilpuma metode) (10). Kā sējmateriāls ir jāizmanto iepriekš eksponēta bioplēve no atbilstīga reaktora.

52. Ja ir izmērīta gan *DOC*, gan konkrētas ķīmiskās vielas noārdīšanās, būtiskas atšķirības (pirmā minētā ir zemāka par otro) starp noārdīšanās īpatsvariem norāda uz organisku starpproduktu klātbūtni attīrītajos notekūdeņos, kurus, iespējams, ir grūtāk noārdīt. Tie ir jāizpēta.

Testēšanas rezultātu derīgums

53. Testēšanu uzskata par derīgu, ja *DOC* (vai *COD*) noārdīšanās pakāpe (D_B) kontroles blokos ir > 80 % pēc divu nedēļu darbības un ja nav iegūti neparasti novērojumi.

54. Ja ir testēta viegli bionoārdāma ķīmiskā viela (ķīmiskā standartviela), bionoārdīšanās pakāpei jābūt > 90 % un atšķirībai starp divām vērtībām nevajadzētu pārsniegt 5 %. Ja nav atbilstības šiem kritērijiem, jāpārskata testēšanas procedūras un/vai jāiegūst sadzīves notekūdens no cita avota.

55. Tāpat arī atšķirībām starp bionoārdīšanās vērtībām no diviem blokiem (ja tos izmanto), kas attīra testējamo ķīmisko vielu, nevajadzētu pārsniegt 5 %. Ja nav atbilstības šim kritērijam, bet noārdīšanās pakāpe ir augsta, analīze ir jāturpina vēl trīs nedēļas. Ja noārdīšanās pakāpe ir zema, jāizpēta testējamās ķīmiskās vielas inhibējošā ietekme, ja tā nav zināma, un tests jāatkārto ar testējamās ķīmiskās vielas zemāku koncentrāciju, ja tas ir iespējams.

Testēšanas pārskats

56. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— identifikācijas dati,

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības.

Testēšanas apstākļi:

— jebkādas testēšanas sistēmas izmaiņas, it sevišķi, ja testē nešķīstošas un gaistošas vielas,

— organiskās barotnes veids,

— rūpniecisko notekūdeņu daļa un veids notekūdeņos, ja to izmanto un ja tas ir zināms,

— sējmateriāla pievienošanas metode,

▼M4

— testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdums – *DOC* un *TOC* saturs, kā sagatavots, ja tā ir suspensija, testēšanā izmantotās koncentrācijas, iemesli, ja *DOC* pārsniedz 10–20 mg/l diapazonu, pievienošanas metode, pirmās pievienošanas datums, jebkādas izmaiņas koncentrācijā,

— vidējais hidrauliskās aiztures laiks (bez vairošanās), caurules rotēšanas ātrums, aptuvenais slīpuma leņķis, ja iespējams,

— dati par nomešanu, laiku un intensitāti,

— testēšanas temperatūra un diapazons,

— izmantotie analītiskie paņēmieni.

Testēšanas rezultāti:

— visi izmērītie dati (*DOC*, *COD*, īpašās analīzes, pH, temperatūra, N ķīmiskās vielas, ja vajadzīgs),

— visi aprēķinātie D_t (vai D_{tc}), D_B un D_s dati tabulas formātā un noārdīšanās līknes,

— informācija par kavējuma un plato fāzēm, testēšanas ilgumu, testējamās ķīmiskās vielas, ķīmiskās standartvielas (ja to testē) un organiskās barotnes noārdīšanās pakāpi (kontroles blokā) kopā ar statistikas informāciju un paziņojumiem par bionoārdīšanos un testēšanas derīgumu,

— rezultātu apspriešana.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.4. nodaļa " "Vieglas" bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana", A–F.

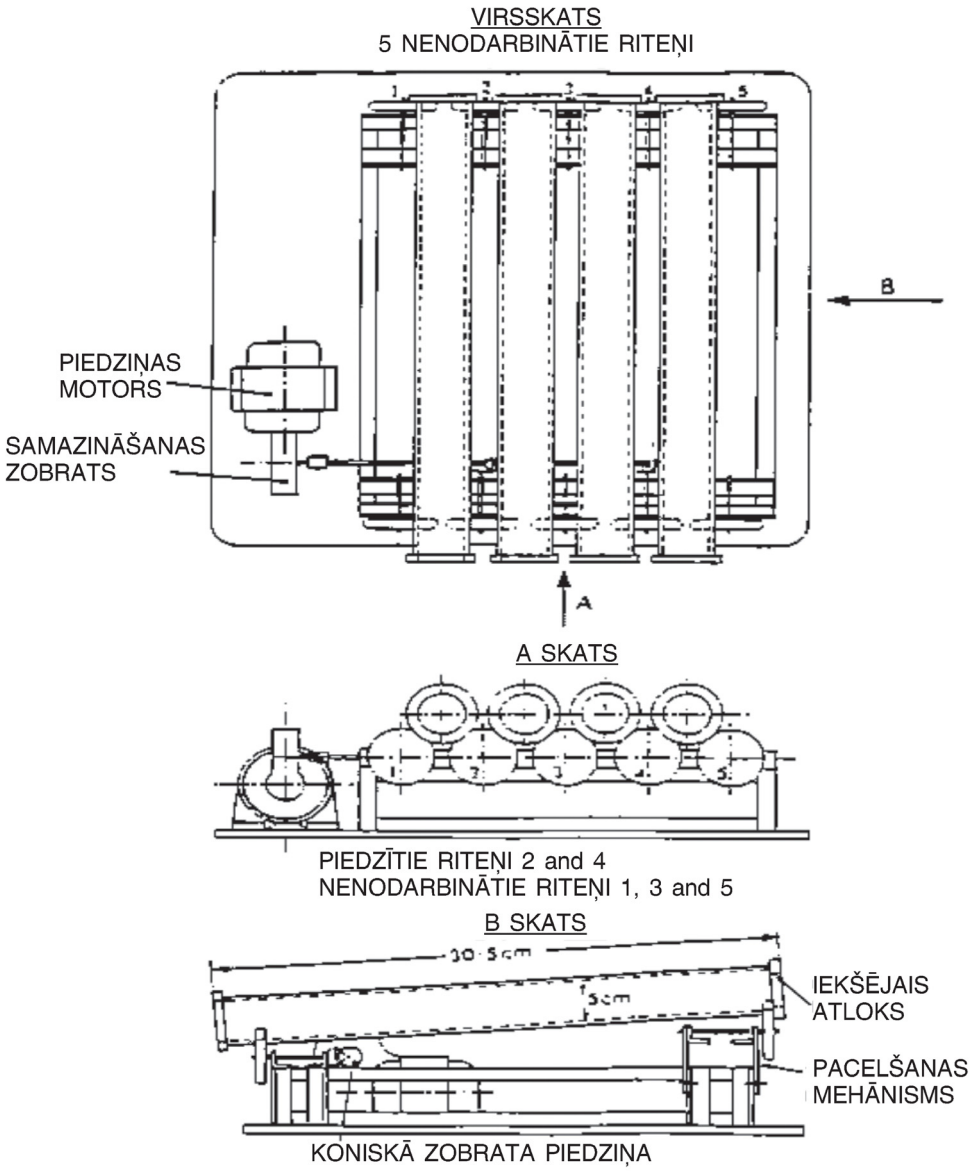
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

8. papildinājums

1. attēls

Rotējošās caurules



Glosārijs

Virsskats:

A/B skats:

Piedzītie riteņi:

Nenodarbinātie riteņi:

Piedziņas motors:

Samazināšanas zobrats:

Iekšējais atloks:

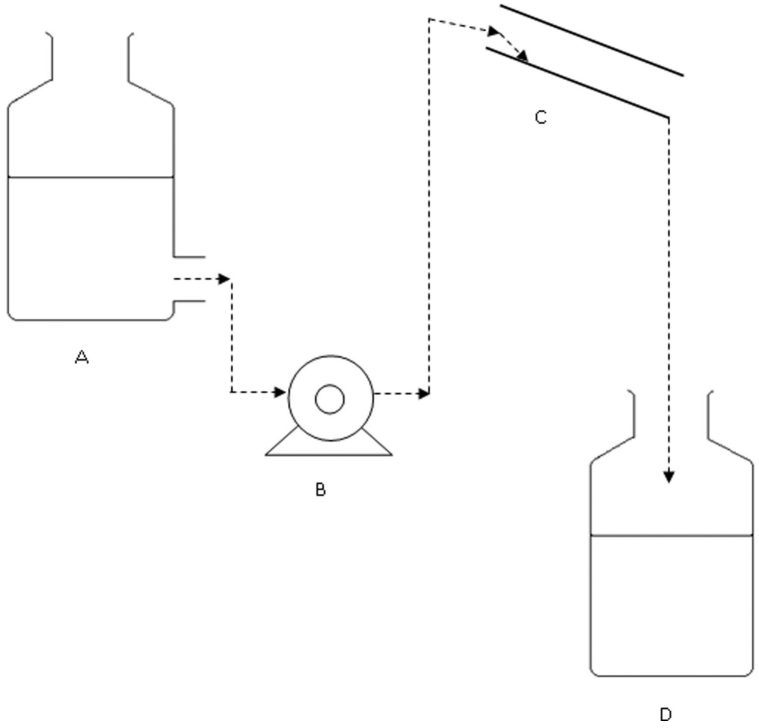
Pacelšanas mehānisms:

Koniskā zobrata piedziņa:

▼M4

2. attēls

Plūsmas diagramma



A: Barotnes tvertne

B: Peristaltiskais sūknis

C: Rotējošā caurule

D: Attīrītā notekūdens savākšanas trauks

DEFINĪCIJAS

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Ķīmiskās vielas: jāņem vērā, ka terminu "ķīmiskā viela" plaši izmanto Apvienoto Nāciju Organizācijas Konferences par vidi un attīstību (turpmāk – *UNCED*) nolīgumos un turpmākos dokumentos, lai aprakstītu vielas, produktus, maisījumus, preparātus vai jebkādus citus terminus, ko var izmantot esošajās sistēmās, lai apzīmētu termina piemērošanas jomu.

▼M6

C.11. AKTĪVO DŪŅU ELPOŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS (OGLEKĻA UN AMONIJA OKSIDĒŠANĀS)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 209 (2010. gads). Šī testa metode raksturo metodi, ar kuru nosaka ķīmisku vielu iedarbību uz aktīvo dūņu sastāvā esošajiem mikroorganismiem (lielākoties baktērijām), noteiktajos apstākļos mērot to elpošanas ātrumu (oglekļa un/vai amonija oksidēšanos) dažādās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijās. Testēšanas metodes pamatā ir *ETAD* (Krāsvielu ražošanas nozares ekoloģijas un toksiskuma asociācija *(Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry)*) tests (1)(2), kādreizējie ESAO Testēšanas norādījumi 209 (3) un pārskatītais ISO standarts 8192 (4). Šīs metodes mērķis ir nodrošināt ātru skrīninga metodi, ar ko iespējams novērtēt ķīmisku vielu ietekmi uz aktīvo dūņu mikroorganismiem bioloģiskās (aerobās) stadijas notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Šā testa rezultāti var kalpot kā rādītājs piemērotu augšanu neinhibējošu testējamo ķīmisko vielu koncentrāciju izmantošanai bionoārdīšanās testos (piemēram, šā pielikuma C.4. A-F, C.9., C.10., C12. un C.29. nodaļa, ESAO TG302C). Šādā gadījumā testu var veikt kā skrīninga testu, kas ir līdzvērtīgs diapazona atrašanas vai robežtestam (sk. 39. punktu), ņemot vērā tikai vispārējo elpošanu. Tomēr tādos vieglas bionoārdīšanās spējas testos (šā pielikuma C.4. A-F un C.29. nodaļa), kuros inokulāta koncentrācija ir ievērojami zemāka nekā šajā testēšanas metodē, šī informācija būtu jāizmanto uzmanīgi. Neinhibēšanās šajā elpošanas testā automātiski nenozīmē, ka šā pielikuma C.4. A-F vai C.29. nodaļā minētajos vieglas bionoārdīšanas spējas testos būs neinhibējoši apstākļi.

2. Kopumā šķiet, ka elpošanas inhibēšanās tests ticis veiksmīgi izmantots kopš tā pirmās publicēšanas, tomēr dažos gadījumos ir ziņots par maldīgiem rezultātiem, piemēram, (2)(4)(5). Dažkārt konstatēts, ka ar koncentrāciju saistītās elpošanas līknes ir divfāzu, devas un atbildreakcijas grafiki ir deformēti un EC_{50} vērtības ir neparedzēti zemas (5). Pētījumi liecina, ka šādus rezultātus iegūst tad, ja testā izmantotās aktīvās dūņas ievērojami nitrificējas un testējamai ķīmiskajai vielai ir lielāka ietekme uz amonija oksidēšanos nekā uz vispārējo heterotrofo oksidēšanos. Tāpēc šādu maldīgu rezultātu iegūšanu var novērst, veicot papildu testēšanu ar īpašu nitrifikācijas inhibitoru. Kopējo, heterotrofisko un nitrifikācijas skābekļa uzņemšanas ātrumu atsevišķi var aprēķināt (4)(7)(8), izmērot skābekļa uzņemšanas ātrumu gan šāda inhibitora, piemēram, *N-allylthiourea* (ATU) klātbūtnē, gan bez tā. Tādējādi var noteikt testējamās ķīmiskās vielas inhibējošo ietekmi uz abiem procesiem un parastajā veidā aprēķināt EC_{50} vērtības gan organiskā oglekļa oksidācijai (heterotrofijai), gan amonija oksidācijai (nitrifikācijai). Jānorāda, ka dažos retos gadījumos *N-allylthiourea* inhibējošā ietekme var būt daļēji vai pilnīgi apturēta, jo tas veido kompleksus ar testējamajām ķīmiskajām vielām vai barotnes bagātinātājiem, piemēram, Cu^{++} joniem (6). Cu^{++} joni ir būtiski *Nitrosomonas* baktērijām, bet lielākā koncentrācijā tie toksiski.

3. Pēdējā laikā jo īpaši Eiropas valstīs aktuāla ir kļuvusi notekūdeņu aerobai apstrādei vajadzīgā nitrifikācija, kas ir nepieciešams posms, kurā atbrīvojas no slāpekļa savienojumiem notekūdeņos, denitrificējot to gāzveida produktos; tagad ES ir noteiktas zemākas slāpekļa koncentrācijas robežvērtības apstrādātajiem efluentiem, kas tiek novadīti saņēmējā ūdensobjektā. ([1])

([1]) Padomes 1991. gada 21. maija Direktīva 91/271/EEK par komunālo notekūdeņu attīrīšanu, (OV L 135, 30.5.1991., 40. lpp.).

▼M6

4. Vairumā gadījumu ar šo metodi var pienācīgi novērtēt ietekmi uz organiskā oglekļa oksidēšanās procesiem. Tomēr dažos gadījumos, lai izprastu ietekmi un interpretētu rezultātus, var būt nepieciešama tikai nitrifikācijas ietekmes pārbaude vai atsevišķi gan nitrifikācijas, gan organiskā oglekļa oksidācijas pārbaude.

TESTA METODES PRINCIPS

5. Elpošanas ātrumu mērkivetē ar skābekļa elektrodu, kurā atrodas aktīvo dūņu paraugs, kam ir pievienoti sintētiskie notekūdeņi, mēra pēc trīs stundu ekspozīcijas perioda. Izvērtējot reālo ekspozīcijas scenāriju, var konstatēt, ka piemērots būtu ilgāks ekspozīcijas periods. Ja testējamā viela strauji degradējas, piemēram, abiotiski (hidrolīze), vai ir gaistoša un koncentrāciju nevar pienācīgi uzturēt, līdztekus var izmantot īsāku ekspozīcijas periodu, piemēram, 30 minūtes. Katras aktīvo dūņu partijas jutību ekspozīcijas dienā pārbauda ar piemērotu ķīmisko standartvielu. Testu parasti izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas EC_x (piemēram, EC_{50}) un/vai nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)*.

6. To, kādā mērā skābeļa uzņemšanu inhibē mikroorganismi, kuri oksidē organisko oglekli, var izteikt atsevišķi no tā, kā to kavē mikroorganismi, kas oksidē amoniju, mērot skābekļa uzņemšanu *N-allylthiourea* klātbūtnē un bez tā; *N-allylthiourea* ir specifisks inhibitors, kas inhibē amonija oksidāciju par nitrītu pirmās stadijas nitrificējošo baktēriju ietekmē. Šajā gadījumā procentuālo skābekļa uzņemšanas inhibēšanos aprēķina, skābekļa uzņemšanas rādītāju testējamās vielas klātbūtnē salīdzinot ar vidējo skābekļa uzņemšanas ātrumu attiecīgajās kontrolgrupās, kas nesatur testējamo vielu – gan specifiskā inhibitora *N-allylthiourea* klātbūtnē, gan bez tā.

7. Jebkuru skābekļa uzņemšanu abiotiskos procesos var detektēt, nosakot tās rādītāju testējamās ķīmiskās vielas, sintētisko notekūdeņu barotnes un ūdens maisījumos, kas neietver aktīvās dūņas.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

8. Lai varētu pareizi interpretēt rezultātus, ir nepieciešama informācija par testējamās ķīmiskās vielas identifikāciju (vēlams *CAS* numurs), nosaukums *(IUPAC)*, tīrības pakāpe, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, gaistamība un adsorbcijas spēja. Parasti gaistošas ķīmiskās vielas nav iespējams adekvāti testēt, ja vien netiek ievēroti īpaši nosacījumi (sk. 21. punktu).

TESTA METODES LIETOJAMĪBA

9. Šo testēšanas metodi var izmantot ūdenī šķīstošām, mazšķīstošām un gaistošām ķīmiskām vielām. Tomēr ne vienmēr ir iespējams iegūt EC_{50} vērtības tādām ķīmiskajām vielām, kuru šķīdība ir ierobežota, bet ticamus rezultātus gaistošām ķīmiskām vielām var iegūt vienīgi tad, ja ekspozīcijas perioda(-u) beigās reakcijas maisījumā ir palikusi lielākā daļa testējamās ķīmiskās vielas (piemēram, > 80 %). Ja ir kāda neskaidrība par testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti vai tās gaistamību, jāiesniedz papildu analītiskie pamatojuma dati, lai precizētu EC_x koncentrāciju.

▼M6

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

10. Ķīmiskās standartvielas ir regulāri jātestē, lai nodrošinātu, ka testēšanas metode un testa nosacījumi ir ticami, un lai ekspozīcijas dienā pārbaudītu katras par mikroorganismu inokulātu izmantotās aktīvo dūņu partijas jutību. Par standartinhibitoru ieteicams izmantot 3,5-dihlorfenolu (3,5-DCP), jo tas ir atzīts elpošanas inhibitors un tiek izmantots daudzos inhibīcijas/toksicitātes testu veidos (4). Arī vara (II) sulfāta pentahidrātu var izmantot par kopējās elpošanas inhibīcijas ķīmisko standartvielu (9). N-metilanilīnu var izmantot par specifisku nitrifikācijas standartinhibitoru (4).

DERĪGUMA KRITĒRIJI UN REPRODUCĒJAMĪBA

11. Tukšajās kontrolgrupās (bez testējamās ķīmiskās vielas vai ķīmiskās standartvielas) skābekļa uzņemšanas rādītājam nevajadzētu būt mazākam par 20 mg skābekļa uz vienu gramu aktīvo dūņu (suspendēto cietvielu daļiņu saussvars) stundā. Ja rādītājs ir mazāks, testēšana jāveic atkārtoti ar skalotām aktīvajām dūņām vai dūņām no cita avota. Skābekļa uzņemšanas rādītāja variācijas koeficients kontrolreplikātos galīgā testa beigās nedrīkst pārsniegt 30 %.

12. 2004. gadā ISO (4) rīkotajā starptautiskajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, kurā izmantoja aktīvās dūņas no sadzīves notekūdeņiem, 3,5-DCP EC_{50} tika konstatēts esam diapazonā no 2 mg/l līdz 25 mg/l kopējai elpošanai, no 5 mg/l līdz 40 mg/l heterotrofiskajai elpošanai un no 0,1 mg/l līdz 10 mg/l nitrifikācijas elpošanai. Ja 3,5-DCP EC_{50} neatrodas prognozētajā diapazonā, testēšana ir jāatkārto, izmantojot aktīvās dūņas no cita avota. Vara (II) sulfāta pentahidrāta EC_{50} būtu jābūt diapazonā no 53 līdz 155 mg/l kopējai elpošanai (9).

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Testa trauki un iekārtas

13. Jāizmanto parastais laboratorijas aprīkojums un turpmāk minētais:

a) testa trauki, piemēram, 1 000 ml vārglāzes, kas satur 500 ml reakcijas maisījuma (sk. Nr. 5 1. attēlā);

b) elements un stiprinājumi izšķīdušā skābekļa mērīšanai; piemērots skābekļa elektrods; slēgts elements, kurā pēc parauga ievietošanas nepaliek brīva vieta, un reģistrēšanas iekārta (piemēram, 2. papildinājuma 1. attēls, Nr. 7, 8, 9); kā alternatīvu var izmantot BSP pudeli ar piemērotu uzmavas adapteri skābekļa elektroda gaisnecaurlaidīgai piestiprināšanai pie pudeles kakla (sk. 3. papildinājuma 2. attēlu). Lai izvairītos no izspiestā šķidruma zuduma, kad tiek ievadīts skābekļa elektrods, ir ieteicams vispirms caur uzmavu ievietot piltuvi vai stikla mēģeni vai izmantot traukus ar zvanveida malām. Abos gadījumos jāizmanto magnētiskais maisītājs vai cita maisīšanas metode, piemēram, zonde, kura pati apmaisa saturu;

c) magnētiskie maisītāji un bīdstieņi, kas pārklāti ar inertu materiālu, izmantošanai mērījumu kamerā un/vai testa traukos;

d) aerācijas ierīce: ja nepieciešams, saspiestais gaiss jāizlaiž caur piemērotu filtru, lai attīrītu to no putekļiem un eļļām, kā arī caur mazgāšanas pudelēm, kurās ir ūdens, lai gaisu mitrinātu. Trauku saturs jāaerē ar Pastēra pipetēm vai citām aerācijas ierīcēm, kas neadsorbē ķīmiskas vielas. Lai nodrošinātu pietiekamu skābekļa piegādi dūņām un novērstu problēmas ar tām ķīmiskajām vielām, kas rada pārmērīgi daudz putu, ir gaistošas un tāpēc notiek to zudums, vai kuras ir grūti disperģēt, tās

▼M6

aerējot ar gaisa ievadi, var izmantot orbitālo šeikeri, kura riņķošanas ātrums ir diapazonā no 150 līdz 250 rpm kolbām ar, piemēram, 2 000 ml tilpumu. Testēšanas sistēma parasti sastāv no vairākām vārglāzēm, kuras pastāvīgi aerē un uzstāda secīgi (piemēram, ik pa 10–15 minūšu intervāliem), bet pēc tam secīgi analizē. Var izmantot arī validētas mērierīces, kas ļauj veikt vienlaicīgu aerāciju un skābekļa patēriņa ātruma mērījumus maisījumos;

e) pH mērītājs;

f) centrifūga, nespecializēta, uz galda novietojama centrifūga dūņu centrifugēšanai ar kapacitāti 10 000 m/s^2.

Reaģenti

14. Vienmēr jāizmanto analītiski tīri reaģenti.

Ūdens

15. Parasti jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, kas satur mazāk nekā 1 mg/l IOO, izņemot gadījumus, ja ir norādīts, ka jāizmanto ūdensvada ūdens bez hlora.

Mākslīgo notekūdeņu barotne

16. Barotne jāsagatavo tāda, lai tā saturētu turpmāk minētās sastāvdaļas norādītajos daudzumos:

— peptons	16 g
— gaļas ekstrakts (vai atbilstošs dārzeņu ekstrakts)	11 g
— urīnviela	3 g
— nātrija hlorīds (NaCl)	0,7 g
— kalcija hlorīda dihidrāts ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnija sulfāta heptahidrāts ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— bezūdens kālija monohidrogēnfosfāts (K_2HPO_4)	2,8 g
— destilēts vai dejonizēts ūdens līdz 1 litram	

17. Šā šķīduma pH jābūt 7,5 ± 0,5. Ja sagatavoto barotni neizmanto uzreiz, tā jāuzglabā tumšā vietā temperatūrā no 0 °C līdz 4 °C ne ilgāk kā vienu nedēļu vai tādos apstākļos, kas neizraisa nekādas izmaiņas barotnes sastāvā. Jānorāda, ka šie sintētiskie notekūdeņi ir simtkārtīgs to notekūdeņu koncentrāts, kas aprakstīti ESAO 1976. gada 11. jūnija tehniskajā ziņojumā "Ieteicamā metode sintētiskajos mazgāšanas līdzekļos izmantoto virsmaktīvo vielu bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšanai" [*Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents*] un kam pievienots dikālija hidrogēnfosfāts.

▼M6

18. Pirms novietošanas glabāšanā barotnes sastāvdaļas var arī atsevišķi sterilizēt, vai arī peptonu un gaļas ekstraktu var pievienot tieši pirms testa sākuma. Pirms lietošanas barotni rūpīgi samaisa un, ja nepieciešams, koriģē pH līdz 7,5 ± 0,5.

Testējamā ķīmiskā viela

19. Ūdenī viegli šķīstošām testējamajām vielām izejšķīdums jāsagatavo tikai līdz maksimālajai šķīdībai ūdenī (nogulsnes nav pieļaujamas). Vielas, kas vāji šķīst ūdenī, maisījumi, kuru sastāvā ir vielas ar atšķirīgu šķīdību ūdenī un adsorbējošas vielas ir jāiesver tieši testēšanas traukos. Šajos gadījumos kā alternatīvu var izmantot izejšķīdumus, ja izšķīdinātās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas analītiski nosaka testēšanas traukos (pirms aktīvo dūņu pievienošanas). Ja tiek sagatavotas ūdenssšķīduma frakcijas *(water-accommodated fraction, WAF)*, svarīgi ir arī analītiski noteikt testējamās ķīmiskās vielas izšķīdinātās koncentrācijas testa traukos. Lietojot organiskos šķīdinātājus, ir jāizvairās uzlabot šķīdību ar disperģentiem/emulgatoriem. Ja ir pietiekami daudz informācijas par testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti attiecīgajos apstākļos, var veikt izejšķīdumu un iepriekšējas maisīšanas suspensiju ultrasonikāciju, piemēram, pa nakti.

20. Testējamā ķīmiskā viela var negatīvi ietekmēt testēšanas sistēmas pH. pH līmenis maisījumos, kas apstrādāti ar testējamo ķīmisko vielu, ir jānosaka iepriekšējā izmēģinājumā, pirms tiek uzsākta testēšana, lai noskaidrotu, vai pirms galvenās testēšanas, kā arī galvenās testēšanas dienā ir nepieciešams veikt pH korekciju. Ja nepieciešams, testējamās ķīmiskās vielas šķīdumi/suspensijas ūdenī ir jāneitralizē pirms inokulāta pievienošanas. Tomēr, tā kā neitralizēšana var izmainīt ķīmiskās vielas ķīmiskās īpašības, atkarībā no pētījuma mērķa varētu veikt papildu testēsanu, lai noskaidrotu testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz dūņām bez pH korekcijas.

21. Gaistošu ķīmisko vielu toksiskās ietekmes līmeņi, jo īpaši testos, kuros caur sistēmu pūš gaisu, var būt nepastāvīgi vielas zuduma dēļ ekspozīcijas laikā. Attiecībā uz šādām vielām jāievēro piesardzība, veicot konkrēto vielu saturošu kontrolmaisījumu vielspecifisku analīzi un mainot aerācijas režīmu.

Ķīmiskā standartviela

22. Ja par ķīmisko standartvielu izmanto 3,5-dihlorfenolu, ir jāsagatavo (15) 1,00 g 3,5-dihlorofenola šķīdums 1 000 ml ūdens. Jāizmanto silts ūdens un/vai ultrasonikācija, lai paātrinātu izšķīšanu un panāktu vajadzīgo tilpumu, kad tas ir atdzisis līdz istabas temperatūrai. Tomēr ir jānodrošina, ka ķīmiskajā standartvielā nerodas strukturālas izmaiņas. Ir jāpārbauda šķīduma pH un, ja nepieciešams, tas jākoriģē ar NaOH vai H_2SO_4, līdz pH sasniedz 7–8.

23. Ja par ķīmisko standartvielu izmanto vara (II) sulfāta pentahidrātu, tas jāizmanto koncentrācijās 58 mg/l, 100 mg/l un 180 mg/l (koeficients 1,8). Vielu iesver tieši testēšanas traukos (29 – 50 – 90 mg, lai sasniegtu 500 ml kopējo tilpumu). Pēc tam to atšķaida ar 234 ml autoklavēta ūdensvada ūdens. Vara (II) sulfāta pentahidrāts ir viegli šķīstošs. Sākot testēšanu, pievieno 16 ml sintētisko notekūdeņu un 250 ml aktīvo dūņu.

▼M6

Specifiskais nitrifikācijas inhibitors

24. Jāsagatavo 2,32 g/l *N-allylthiourea* (ATU) izejšķīduma. Pievienojot 2,5 ml izejšķīduma inkubācijas maisījumam, kura galīgais tilpums ir 500 ml, iegūst galīgo koncentrāciju 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l); ir zināms, ka tā ir pietiekama (4), lai panāktu nitrifikācijas 100 % inhibēšanos nitrificējošās aktīvajās dūņās, kas satur 1,5 g/l suspendētu cietvielu.

Abiotiskā kontrolgrupa

25. Dažos retos apstākļos testējamā ķīmiskā viela ar stipra reducētāja īpašībām var izraisīt izmērāmu abiotisko skābekļa patēriņu. Šādos gadījumos ir nepieciešama abiotiskā kontrolgrupa, lai atšķirtu testējamās ķīmiskās vielas abiotisko skābekļa uzņemšanu un mikroorganismu elpošanu. Abiotiskās kontrolgrupas var sagatavot, nepievienojot testa maisījumiem inokulātu. Līdzīgi arī abiotiskās kontrolgrupas bez inokulāta var izmantot tad, kad tiek veikti analītiskie palīgmērījumi, lai noteiktu sasniegto koncentrāciju testēšanas ekspozīcijas posmā, piemēram, kad tiek izmantoti tādu ķīmisku vielu izejšķīdumi, kuras vāji šķīst ūdenī, kopā ar komponentiem, kam ir atšķirīga šķīdība ūdenī. Īpašos gadījumos var būt nepieciešams sagatavot abiotisku kontrolgrupu ar sterilizētu inokulātu (piemēram, autoklavējot vai pievienojot sterilizējošus toksikantus). Dažas ķīmiskas vielas var ražot vai patērēt skābekli tikai tad, ja virsmas laukums ir pietiekami liels reakcijai, pat ja parasti šādai reakcijai ir nepieciešama daudz augstāka temperatūra vai spiediens. Tāpēc īpaša vērība būtu jāpievērš peroksīdiem. Sterilizēts inokulāts nodrošina lielu virsmas laukumu.

Inokulāts

26. Vispārējai lietošanai aktīvās dūņas būtu jāsavāc no tādas labi pārvaldītas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas aerācijas baseina izvadvietas, kurā galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus, vai pie tvertnes izvadvietas. Atkarībā no testa mērķa var izmantot arī citus piemērotus aktīvo dūņu veidus vai avotus, piemēram, var izmantot arī laboratorijā audzētas dūņas atbilstošās suspendēto cietvielu koncentrācijās no 2 g/l līdz 4 g/l. Tomēr dūņām no dažādām attīrīšanas iekārtām parasti ir atšķirīgas īpašības un jutība.

27. Dūņas var izmantot tādas, kādas tās ir savāktas, tomēr rupjākās daļiņas būtu jānoņem, tās neilgu laiku, piemēram, 5 līdz 15 minūtes nostādinot un nolejot augšējo slāni ar smalkajām daļiņām vai izsijājot (piemēram, ar 1 mm^2 acu sietu). Dūņas var arī aptuveni 15 sekundes vai ilgāk homogenizēt maisītājā, bet jāievēro piesardzība attiecībā uz bīdes spēkiem un temperatūras izmaiņām, kas var rasties, ilgstoši maisot.

28. Bieži ir nepieciešama dūņu skalošana, piemēram, ja endogēnās elpošanas rādītājs ir zems. Dūņas vispirms nepieciešams kādu laiku centrifugēt, lai iegūtu dzidru virsējo slāni un notekūdeņu cietvielu granulas, piemēram, 10 minūtes ar apt. 10 000 m/s^2 lielu paātrinājumu. Dzidro virsējo slāni izlej, bet dūņas atkārtoti suspendē nehlorētā ūdensvada ūdenī kratot; skalošanas ūdens pēc tam ir jāatdala, atkārtojot centrifugēšanu un izliešanu. Ja nepieciešams, skalošanu un centrifugēšanu atkārto. Atkārtoti jānosaka atkalsuspendēto dūņu zināma tilpuma sausmasa un dūņas jākoncentrē, nolejot šķidrumu vai tālāk jāatšķaida ar nehlorētu ūdensvada ūdeni, lai iegūtu nepieciešamo

▼M6

dūņu cietvielu koncentrāciju 3 g/l. Aktīvajām dūņām pastāvīgi veicama aerācija (piemēram, 2 l/minūtē) testa temperatūrā, un ja vien iespējams, tās jāizlieto savākšanas dienā. Ja tas nav iespējams, dūņām divas papildu dienas ik dienas jāpievada sintētiskie notekūdeņi (50 ml sintētisko notekūdeņi uz litru aktīvo dūņu). Pēc tam dūņas izmanto testā, un rezultātus uzskata par derīgiem, ja to aktivitātē nav radušās būtiskas izmaiņas, ko novērtē, izmērot to endogēno heterotrofo un nitrifikācijas elpošanas ātrumu.

29. Var rasties grūtības, ja inkubācijas perioda laikā rodas putas tādā daudzumā, ka putas un uz tām esošās dūņu daļiņas tiek izvadītas no aerācijas tvertnēm. Reizēm putu cēlonis ir sintētisko notekūdeņu klātbūtne, bet, ja testējamā ķīmiskā viela ir virsmaktīva vai satur virsmaktīvas vielas, jāparedz, ka parādīsies putas. Dūņu daļiņu zudums no testa maisījumiem radīs mākslīgi pazeminātu elpošanas rādītāju, ko kļūdaini varētu interpretēt kā inhibīcijas rezultātu. Turklāt virsmaktīvā šķīduma aerācija koncentrē virsmaktīvo vielu putu slānī; tādēļ putu zudums no testēšanas sistēmas samazina ekspozīcijas koncentrāciju. Putas var kontrolēt ar vienkāršām mehāniskām metodēm (piemēram, neregulāra manuāla maisīšana ar stikla nūjiņu) vai pievienojot silikona emulsijas pretputošanas līdzekli bez virsmaktīvās vielas, un/vai izmantojot kolbu kratīšanas aerācijas metodi. Ja problēma ir saistīta ar sintētisko notekūdeņu klātbūtni, ir jāmaina sintētisko notekūdeņu sastāvs, iekļaujot pretputošanas reaģentu, piemēram, 50 µl/l. Ja putošanu izraisa testējamā ķīmiskā viela, daudzums, kas vajadzīgs putošanas samazināšanai, būtu jānosaka maksimālajā testa koncentrācijā un pēc tam tāpat jāapstrādā katrs aerācijas trauks (tostarp tie trauki, kuros nav putu, piemēram, tukšās kontrolgrupas un standarttrauki). Ja izmanto pretputu līdzekļus, tie nedrīkst mijiedarboties ar inokulātu un/vai testējamo ķīmisko vielu.

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA

30. Iespējams noteikt trīs atšķirīgu skābekļa uzņemšanas veidu – kopējā, tikai heterotrofā un nitrifikācijas – inhibīciju. Parasti pietiek ar kopējā skābekļa uzņemšanas inhibīcijas mērījumu. Ietekme uz heterotrofo skābekļa uzņemšanu no organiskā oglekļa oksidēšanās un amonija oksidācijas dēļ ir vajadzīga tikai tad, ja attiecībā uz konkrētu ķīmisku vielu ir vajadzība pēc šādiem diviem atsevišķiem beigupunktiem, vai (neobligāti) ir jāizskaidro netipiskas kopējā skābekļa uzņemšanas inhibīcijas devas un atbildreakcijas saskarības līknes.

Testa apstākļi

31. Testēšana jāveic 20 ± 2 °C temperatūrā.

Testa maisījumi

32. Jāsagatavo testa maisījumi (F_T, kā norādīts 1. tabulā), kas satur ūdeni, sintētiskos notekūdeņus un testējamo ķīmisko vielu, lai iegūtu atšķirīgas testējamās ķīmiskās vielas nominālās koncentrācijas (sastāvdaļu apjomu piemēru sk. 1. tabulā). Ja nepieciešams, jākoriģē pH līdz 7,5 ± 0,5, maisījumi ir jāatšķaida ar ūdeni un tiem jāpievieno inokulāts, lai traukos iegūtu vienādus beigu tilpumus un sāktu aerāciju.

Standartmaisījumi

33. Maisījumi (F_R) sagatavojami tieši tāpat kā testa maisījumi, tikai ar ķīmisko standartvielu, piemēram, 3,5-dihlorofenolu testējamās ķīmiskās vielas vietā.

▼M6

Tukšie kontrolparaugi

34. Testos, kur testa vārglāzes uzstāda secīgi intervālos, tukšos kontrolparaugus (F_B) sagatavo ekspozīcijas perioda sākumā un beigās. Testos, kuros izmanto aprīkojumu, kas ļauj veikt vienlaicīgus skābekļa patēriņa mērījumus, katrā vienlaicīgās analīzes partijā ir jāiekļauj vismaz divi tukšie kontrolparaugi. Tukšie kontrolparaugi satur vienādu aktīvo dūņu un sintētiskās barotnes daudzumu, bet tajos nav iekļauta ne testējamā ķīmiskā viela, ne ķīmiskā standartviela. Tās ir jāatšķaida ar ūdeni līdz tādam pašam tilpumam kā testa un standartmaisījumi.

Abiotiskā kontrolgrupa

35. Ja nepieciešams – piemēram, ja zināms vai iespējams, ka testējamai ķīmiskajai vielai ir stipra reducētāja īpašības – jāsagatavo maisījums F_A, lai veiktu abiotiskā skābekļa patēriņa mērījumus. Maisījumā jābūt tādam pašam testējamās ķīmiskās vielas un sintētisko notekūdeņu daudzumam, kā arī tikpat lielam tilpumam kā testa maisījumam, bet tam nepievieno aktīvās dūņas.

Vispārīgas procedūras un mērījumi

36. Testa maisījumus, standartmaisījumus, kā arī tukšos un abiotiskos kontrolparaugus inkubē testa temperatūrā piespiedu aerācijas apstākļos (0,5 līdz 1 l/min), lai nodrošinātu izšķīdušā skābekļa satura koncentrāciju 60–70 % un paturētu dūņu daļiņas suspendētas. Nepieciešama arī kultūru maisīšana, lai dūņu daļiņas saglabātu suspensijā. Inkubācija uzskatāma par sāktu, kad aktīvo dūņu inokulāts sākotnēji saskaras ar pārējām galīgā maisījuma sastāvdaļām. Inkubācijas noslēgumā pēc noteiktajiem ekspozīcijas periodiem, kas parasti ilgst trīs stundas, paraugi tiek izņemti, lai izmērītu izšķīdušā skābekļa koncentrācijas samazinājuma rādītāju elementā, kas paredzēts īpaši šim nolūkam (3. papildinājuma 2. attēls), vai pilnīgi piepildītā BSP pudelē. Veids, kādā tiek uzsākta inkubācija, ir atkarīgs arī no skābekļa patēriņa rādītāja mērīšanai izmantotā aprīkojuma kapacitātes. Piemēram, ja tajā ir viena skābekļa zonde, mērījumi tiek veikti atsevišķi. Šajā gadījumā dažādos maisījumus, kas nepieciešami testam ar sintētiskajiem notekūdeņiem, sagatavo, bet inokulātu nepievieno; nepieciešamo dūņu daudzumu pievieno katrā sērijas traukā. Katru inkubāciju uzsāk pēc kārtas, izmantojot ērtus laika intervālus, piemēram, ik pa 10 līdz 15 minūtēm. Mērīšanas sistēmā var būt arī vairākas zondes, kas atvieglo vairāku vienlaicīgu mērījumu veikšanu; šajā gadījumā inokulātu attiecīgajām trauku grupām var pievienot vienā laikā.

37. Aktīvo dūņu koncentrācija visos testa, standarta un tukšajos (be ne abiotisko kontrolparaugu) maisījumos parasti ir 1,5 g/l suspendēto cietvielu. Skābekļa patēriņš ir jāmēra pēc trīs stundu ekspozīcijas perioda. Papildu 30 minūšu ekspozīcijas mērījumi jāveic pēc nepieciešamības atbilstoši 5. punktā aprakstītajam.

Dūņu spēja nitrificēties

38. Lai noskaidrotu dūņu spēju nitrificēties un iespējamo nitrifikācijas rādītāju, jāsagatavo tādi maisījumi (F_B) kā tukšajās kontrolgrupās un papildu "kontrolgrupas" maisījumi (F_N), kas arī satur *N-allylthiourea* 11,6 mg/l

▼M6

apjomā. Maisījumus aerē un inkubē 20 °C ± 2 °C temperatūrā 3 stundas. Pēc tam jāizmēra skābekļa uzņemšanas ātrums un jāaprēķina skābekļa uzņemšanas ātrums nitrifikācijas dēļ.

Testa plāns

Diapazona noteikšanas tests

39. Kad nepieciešams, var veikt provizorisku testēšanu, lai aplēstu, kāds testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju diapazons būtu izmantojams galīgā testa laikā, lai noteiktu skābekļa patēriņa inhibīciju. Testējamās ķīmiskās vielas skābekļa patēriņa inhibīcijas neesamība provizoriskajā testēšanā var arī norādīt, ka nav nepieciešams veikt galīgo testu, bet jāiekļauj provizoriskās testēšanas augstāko koncentrāciju triplikāts (parasti 1 000 mg/l, bet tas atkarīgs no datu prasībām).

1. tabula

Provizoriskās testēšanas maisījumu piemēri

Reaģents	Sākotnējā koncentrācija				
Testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdums	10 g/l				
Sintētiskās barotnes izejšķīdums	Sk. 16. punktu.				
Aktīvo dūņu izejsuspensija	3 g/l suspendēto cietvielu				
Maisījumu sastāvdaļas	Devas testēšanas traukos ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdums (ml) (19. līdz 21. punkts)	0,5	5	50	0	50
Sintētisko notekūdeņu izejšķīdums (ml) (16. punkts)	16	16	16	16	16
Aktīvo dūņu suspensija (ml) (26. līdz 29. punkts)	250	250	250	250	0
Ūdens (15. punkts)	233,5	229	184	234	434
Kopējais maisījumu tilpums (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrācijas maisījumā					
Testa suspensija (mg/l) Aktīvās dūņas	10	100	1 000	0	1 000
(suspendētās cietvielas) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Tā pati procedūra jāveic attiecībā uz ķīmisko standartvielu, lai piepildītu kolbas F_{R1-3}

40. Tests veicams, izmantojot vismaz trīs testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas, piemēram, 10 mg/l, 100 mg/l un 1 000 mg/l, ar tukšo kontrolparaugu un, ja nepieciešams, vismaz trīs abiotiskajiem kontrolparaugiem ar augstāko testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (piemēru sk. 1. tabulā). Ideālā

▼M6

variantā zemākajai koncentrācijai nevajadzētu ietekmēt skābekļa patēriņu. Ja nepieciešams, jāaprēķina skābekļa uzņemšanas un nitrifikācijas rādītājs; tad jāaprēķina inhibīcija procentos. Atkarībā no testa mērķa ir iespējams arī vienkārši noteikt robežkoncentrācijas, piemēram, 1 000 mg/l, toksicitāti. Ja šajā koncentrācijā neparādās statistiski nozīmīga toksiska ietekme, nav nepieciešama turpmāka testēšana ar lielākām vai mazākām koncentrācijām. Jāievēro, ka vielas, kas vāji šķīst ūdenī, maisījumi, kuru sastāvā ir vielas ar atšķirīgu šķīdību ūdenī, un adsorbējošas vielas ir jāiesver tieši testēšanas traukos. Šajā gadījumā tilpums, kas rezervēts testa ķīmiskās vielas izejšķīdumam, ir jāaizvieto ar atšķaidīšanas ūdeni.

Galīgais tests

Kopējās skābekļa uzņemšanas inhibīcija

41. Tests veicams, izmantojot tādu koncentrāciju diapazonu, kas izsecināts no provizoriskās testēšanas rezultātiem. Lai iegūtu gan *NOEC*, gan EC_x (piemēram, EC_{50}), lielākajā daļā gadījumu ieteicami seši kontrolparaugi un piecas apstrādes koncentrācijas ģeometriskā progresijā ar pieciem replikātiem. Abiotisko kontroli nav nepieciešams atkārtot, ja provizoriskajā testēšanā nav notikusi skābekļa uzņemšana, tomēr, ja ir notikusi būtiska skābekļa uzņemšana, abiotiskie kontrolparaugi būtu jāietver katrai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai. Dūņu jutība jāpārbauda, izmantojot ķīmisko standartvielu 3,5-dihlorofenolu. Dūņu jutība ir jāpārbauda katrai testa sērijai, jo ir zināms, ka jutība ir svārstīga. Testa paraugi no testa traukiem vienmēr ir jāizņem pēc 3 stundām un, ja nepieciešams, papildus pēc 30 minūtēm, lai veiktu skābekļa uzņemšanas rādītāja mērījumus skābekļa elektroda elementā. No savāktajiem datiem aprēķina kontrolparaugu un testa maisījumu īpatnējos elpošanas rādītājus; pēc tam atbilstoši šeit sniegtajam 7. vienādojumam aprēķina inhibīciju procentos.

Diferenciācija starp heterotrofo elpošanu un nitrifikāciju

42. Īpaša nitrifikācijas inhibitora ATU izmantošana ļauj tieši novērtēt testējamo ķīmisko vielu inhibitoro ietekmi uz heterotrofo oksidāciju, un, atņemot skābekļa uzņemšanas rādītāju ATU klātbūtnē no kopējā uzņemšanas rādītāja (bez ATU), var aprēķināt ietekmi uz nitrifikācijas rādītāju. Jāsagatavo divi reakcijas maisījumu komplekti atbilstoši testa plānam EC_x vai *NOEC* noteikšanai, kā izklāstīts 41. punktā, bet papildus katram viena komplekta maisījumam jāpievieno ATU galīgajā koncentrācijā 11,6 mg/l; ir konstatēts, ka šāda koncentrācija pilnīgi aptur nitrifikāciju dūņās, kuru suspendēto cietvielu koncentrācijas ir līdz 3 000 mg/l (4). Pēc ekspozīcijas perioda beigām jāizmēra skābekļa uzņemšanas rādītājs; šīs tiešās vērtības parāda tikai heterotrofās elpošanas rādītāju, atšķirības starp šiem un attiecīgajiem kopējiem elpošanas rādītājiem parāda nitrifikāciju. Pēc tam var aprēķināt dažādas inhibīcijas pakāpes.

Mērījumi

43. Pēc ekspozīcijas perioda(-u) beigām paraugs no pirmā aerācijas trauka jāpārvieto uz skābekļa elektroda elementu (2. papildinājuma 1. attēls) un nekavējoties jāizmēra izšķīdušā skābekļa koncentrācija. Ja ir pieejama vairāku elektrodu sistēma, tad mērījumus var veikt vienlaicīgi. Ir svarīgi, lai maisīšanas (ar nosegtu magnētu) ātrums būtu tāds pats kā tad, kad elektrods kalibrēts, lai nodrošinātu, ka zonde reaģē uz skābekļa koncentrācijas izmaiņām ar minimālu aizkavēšanos un lai varētu mērījumu traukā regulāri veikt reproducējamus skābekļa mērījumus. Parasti pietiek ar dažu skābekļa

▼M6

elektrodu zondes sistēmu, kas pati apmaisa saturu. Laikā starp mērījumiem elements ir jāizskalo ar ūdeni. Ar paraugu var arī uzpildīt BSP pudeli (3. papildinājuma 2. attēls), kas aprīkota ar magnētisko maisītāju. Tad skābekļa zondi ar uzmavas adapteri ievieto pudeles kaklā un iedarbina magnētisko maisītāju. Abos gadījumos izšķīdušā skābekļa koncentrācijas kādu laiku pastāvīgi mēra un reģistrē, parasti 5 līdz 10 minūtes vai līdz brīdim, kad skābekļa koncentrācija nokrītas zem 2 mg/l. Elektrods ir jānoņem, maisījums jāielej atpakaļ aerācijas traukā, un jāturpina aerācija un maisīšana, ja ir nepieciešams veikt mērījumus pēc ilgākiem ekspozīcijas periodiem.

Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas verifikācija

44. Noteiktiem mērķiem var būt nepieciešams mērīt testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju testa traukos. Jānorāda, ka, ja tiek izmantoti turpmāk minēto vielu izejšķīdumi:

— ūdenī vāji šķīstošas vielas;

— maisījumi, kuros ir sastāvdaļas ar atšķirīgu šķīdību ūdenī;

— vielas ar labu šķīdību ūdenī, bet gadījumos, kad izejšķīduma koncentrācija ir tuvu maksimālajai šķīdībai ūdenī,

izšķīdusī frakcija nav zināma un nav zināma uz testa traukiem pārvietotās testējamās ķīmiskās vielas patiesā koncentrācija. Lai raksturotu ekspozīciju, ir nepieciešams veikt testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju analītisko aplēšanu. Lai to vienkāršotu, analītiskā aplēšana veicama pirms inokulāta pievienošanas. Tā kā uz testa traukiem pārvieto tikai izšķīdušās frakcijas, izmērītās koncentrācijas var būt ļoti zemas.

45. Lai izvairītos no laikietilpīgas un dārgas analīzes, ir ieteicams vienkārši iesvērt testējamo ķīmisko vielu tieši testa traukos un turpmākajos aprēķinos norādīt sākotnēji nosvērto nominālo koncentrāciju. Diferencēšana starp testējamās ķīmiskās vielas izšķīdušajām, neizšķīdušajām vai adsorbētajām frakcijām nav nepieciešama, jo arī reālos apstākļos visas šīs frakcijas atrodas notekūdeņu attīrīšanas iekārtās un šīs frakcijas var būt atšķirīgas atkarībā no notekūdeņu sastāva. Šīs testēšanas metodes mērķis ir reālistiski aplēst koncentrāciju, kas neizraisa inhibēšanos, un tā nav piemērota tam, lai sīkāk izmeklētu, kuras frakcijas veicina aktīvo dūņu organismu inhibēšanos. Visbeidzot, arī adsorbējošās vielas ir jāiesver tieši testa traukos un trauki ir jāsilanizē, lai samazinātu zudumus adsorbcijas dēļ.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Skābekļa uzņemšanas rādītāju aprēķināšana

46. Skābekļa uzņemšanas rādītājus aprēķina no izmērīto vērtību vidējās vērtības, piemēram, no lineārajām daļām līknēs, kas ataino skābekļa koncentrācijas izmaiņas laikā; aprēķinus veic tikai skābekļa koncentrācijām starp 2,0 mg/l un 7,0 mg/l, jo augstākas un zemākas koncentrācijas pašas var ietekmēt patēriņa rādītājus. Novirze koncentrāciju joslās zemāk vai augstāk par šīm vērtībām reizēm ir neizbēgama un nepieciešama, piemēram, ja elpošana ir ievērojami nomākta un tāpēc norit ļoti lēni vai ja konkrētās aktīvās dūņas elpo ļoti ātri. Tas ir pieļaujams, ja skābekļa uzņemšanas grafika paplašinātās

▼**M6**

daļas ir taisnas un to slīpums nemainās, šķērsojot 2,0 mg/l vai 7,0 mg/l O_2 robežas. Jebkuras izliektas līknes daļas norāda, ka mērīšanas sistēma stabilizējas vai ka uzņemšanas rādītājs mainās, un tās nav izmantojamas elpošanas rādītāja aprēķinos. Skābekļa uzņemšanas rādītājs jāizsaka miligramos uz litru stundā (mg/lh) vai miligramos uz gramu sauso dūņu stundā (mg/gh). Skābekļa patēriņa ātrumu R, izteiktu mg/lh, var aprēķināt vai interpolēt no reģistrētā skābekļa samazinājuma līknes lineārās daļas saskaņā ar 1. vienādojumu:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

kur:

Q_1 ir skābekļa koncentrācija lineārās fāzes izraudzītās daļas sākumā (mg/l);

Q_2 ir skābekļa koncentrācija lineārās fāzes izraudzītās daļas beigās (mg/l);

Δ_t ir laika intervāls starp šiem mērījumiem (min).

47. Īpatnējo elpošanas rādītāju (R_s) izsaka kā skābekļa daudzums, kuru patērē uz g dūņu saussvara stundā (mg/gh) atbilstoši 2. vienādojumam:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

kur SS ir suspendēto cietvielu koncentrācija testa maisījumā (g/l).

48. Atšķirīgie R indeksi, kurus var kombinēt, ir šādi:

S īpatnējais rādītājs

T kopējais elpošanas rādītājs

N nitrifikācijas noteiktais rādītājs

H heterotrofās elpošanas noteiktais rādītājs

A abiotisko procesu noteiktais rādītājs

B rādītājs, kura pamatā ir tukšie testi (vidējā vērtība)

Nitrifikācijas noteiktās skābekļa uzņemšanas rādītāja aprēķināšana

49. Attiecība starp kopējo elpošanu (R_T), nitrifikācijas elpošanu (R_N) un heterotrofo elpošanu (R_H) ir norādīta 3. vienādojumā:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

kur:

R_N ir nitrifikācijas noteiktā skābekļa uzņemšana (mg/lh);

R_T ir izmērītais skābekļa uzņemšanas rādītājs tukšajā kontrolparaugā (bez ATU; F_B) (mg/lh);

R_H ir izmērītais skābekļa uzņemšanas rādītājs tukšajā kontrolparaugā ar pievienotu ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Šī sakarība ir derīga tukšajiem paraugiem noteiktajām vērtībām (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotiskajai kontrolgrupai (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) un testiem ar testējamajām ķīmiskajām vielām (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Īpatnējos skābekļa uzņemšanas rādītājus aprēķina šādi:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Ja provizoriskajā testēšanā R_N ir nenozīmīgs (piemēram, < 5 % no R_T tukšajos kontrolparaugos), var pieņemt, ka heterotrofā skābekļa uzņemšana ir vienāda ar kopējo uzņemšanu un nitrifikācija nenotiek. Būtu vajadzīgs cits aktīvo dūņu avots, ja testos ņemtu vērā ietekmi uz heterotrofiem un nitrificējošiem mikroorganismiem. Galīgo testu veic, ja ir pierādījumi par nomāktas skābekļa uzņemšanas rādītājiem atšķirīgās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijās.

Procentuālās inhibīcijas aprēķināšana

52. Procentuālo inhibīciju I_T no kopējā skābekļa patēriņa pie katras testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas aprēķina pēc 7. vienādojuma:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Līdzīgā kārtā heterotrofās skābekļa uzņemšanas procentuālo inhibīciju I_H pie katras testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas aprēķina pēc 8. vienādojuma:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Visbeidzot, skābekļa patēriņa inhibēšanos nitrifikācijas dēļ pie katras koncentrācijas aprēķina pēc 9. vienādojuma:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Skābekļa uzņemšanas procentuālo inhibēšanos atliek pret attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas logaritmu (inhibīcijas līkne, sk. 4. papildinājuma 3. attēlu). Inhibīcijas līknes grafiski attēlo katram 3 stundu aerācijas periodam vai attiecīgi pēc 30 minūtēm. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas inhibē skābekļa uzņemšanu par 50 % (EC_{50}), jāaprēķina vai jāinterpolē no līknes. Ja ir pieejami piemēroti dati, var aprēķināt vai interpolēt EC_{50} 95 % ticamības robežas, līknes virziena koeficientu un piemērotas vērtības, ko var atzīmēt kā inhibēšanās sākumu (piemēram, EC_{10} vai EC_{20}) un inhibēšanās diapazona beigas (piemēram, EC_{80} vai EC_{90}).

56. Jāievēro, attiecībā uz mainību, ko bieži novēro rezultātos, daudzos gadījumos var būt pietiekami rezultātus papildus izteikt kārtās:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l līdz 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l līdz 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Rezultātu interpretēšana

EC_x

▼M6

57. EC_x vērtības, tostarp ar tām saistītās parametra apakšējās un augšējās 95 % ticamības robežas, aprēķina, izmantojot piemērotas statistiskās metodes (piemēram, probita analīzi, logistisko vai Veibula funkciju, saīsināto Spīrmena–Kerbera *(Spearman-Kärber)* metodi vai vienkāršu interpolāciju (11)). EC_x iegūst, vērtību, kas atbilst x % no kontrolparaugu vidējās vērtības, ievietojot iegūtajā vienādojumā. Lai aprēķinātu EC_{50} vai jebkuru citu EC_x, pirmsapstrādes vidējām vērtībām (x) ir jāveic regresijas analīze.

NOEC aplēšana

58. Ja plānots ar statistisko analīzi noteikt *NOEC*, ir nepieciešama statistika par katru trauku (katrs trauks tiek uzskatīts par replikātu). Attiecīgas statistiskās metodes būtu jāizmanto atbilstoši ESAO dokumentam par *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). Parasti testējamās ķīmiskās vielas nelabvēlīgo ietekmi salīdzinājumā ar kontrolparaugu izmeklē, izmantojot vienpusēju (mazāku) hipotēžu pārbaudi pie $p \leq 0,05$.

Testēšanas pārskats

59. Testēšanas pārskatā ietverama turpmāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, CAS numurs, tīrības pakāpe;

— testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības (piemēram, log Kow, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, Henrija konstante (H) un iespējamā informācija par testējamās ķīmiskās vielas apriti vidē un mijiedarbību ar to, piemēram, adsorbciju pie aktīvajām dūņām).

Testēšanas sistēma

— avots, notekūdeņu attīrīšanas iekārtas darbības apstākļi un influents, koncentrācija, aktīvo dūņu pirmapstrāde un uzturēšana.

Testa apstākļi:

— testa temperatūra, pH līmenis testēšanas laikā un ekspozīcijas fāzes (fāžu) laikā.

Rezultāti:

— īpatnējais skābekļa patēriņš kontrolparaugos (mg O_2/(g dūņu × h));

— visi izmērītie dati, inhibēšanās līkne(-s) un EC_{50} aprēķina metode;

— EC_{50} un, ja iespējams, 95 procentu ticamības robežas, iespējams, EC_{20}, EC_{80}; iespējams, *NOEC* un izmantotās statistiskās metodes, ja EC_{50} nav nosakāms;

— kopējā un attiecīgā gadījumā heterotrofā un nitrifikācijas inhibīcija;

— abiotiskā skābekļa uzņemšana fizikālķīmiskajā kontrolparaugā (ja tādu izmanto);

— ķīmiskās standartvielas nosaukums un ar šo vielu iegūtie rezultāti;

— visi novērojumi un novirzes no standartprocedūras, kam varētu būt bijusi ietekme uz rezultātu.

LITERATŪRA

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, 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-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and 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. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (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 aqueous medium, International Organization for Standardization.

(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, Paris.

▼M6

1. papildinājums

Definīcijas

Šai metodei ir piemērojamas turpmāk norādītās terminu definīcijas.

Ķīmiska viela ir viela vai to maisījums.

EC_x (ietekmes koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, kas konkrētā ekspozīcijas periodā uz testa organismiem atstāj x % ietekmi salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Piemēram, EC_{50} ir aplēstā koncentrācija, kas noteiktā ekspozīcijas periodā atstāj ietekmi uz testa beigupunktu 50 procentos no eksponētās populācijas.

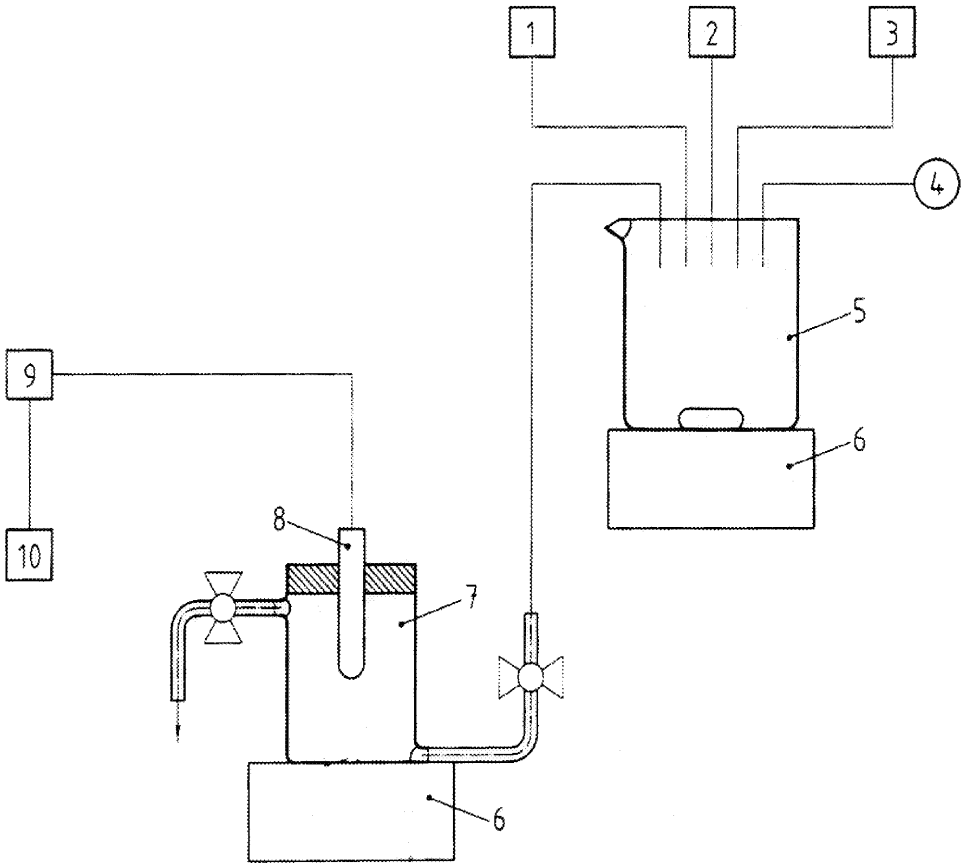
NOEC **(nenovērojamās ietekmes koncentrācija)** ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, pie kuras nav novērojama ietekme. Šajā testā koncentrācijai, kas atbilst *NOEC*, dotā ekspozīcijas periodā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$), salīdzinot ar kontrolparaugu.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼**M6**

2. papildinājums

1. attēls. **Mērījumu ierīces piemēri**



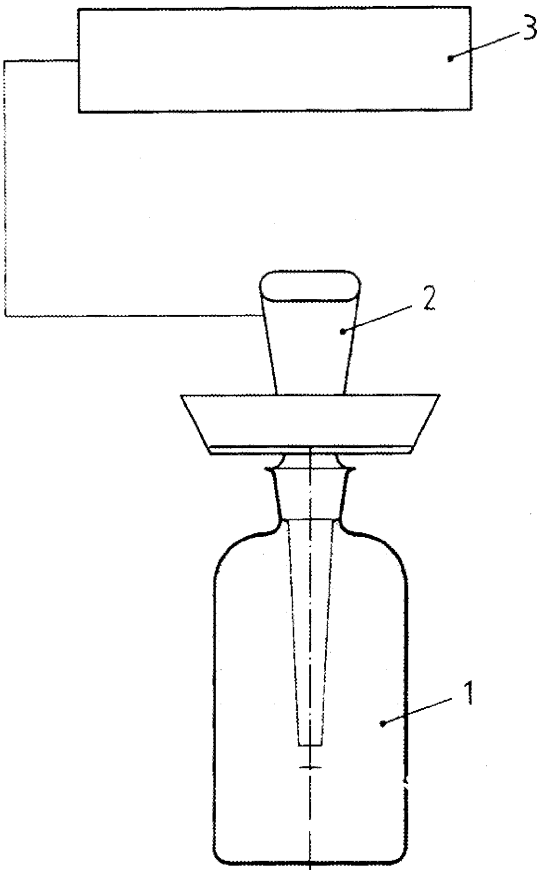
Skaidrojums

1	aktīvās dūņas	6	magnētiskais maisītājs
2	sintētiskā barotne	7	skābekļa mērelements
3	testējamā ķīmiskā viela	8	skābekļa elektrods
4	gaiss	9	skābekļa mērierīce
5	maisīšanas trauks	10	reģistrators

▼**M6**

3. papildinājums

2. attēls. **Mērījumu ierīces piemērs, kurā izmanto BSP noteikšanas pudeli**



Skaidrojums

1 testa trauks

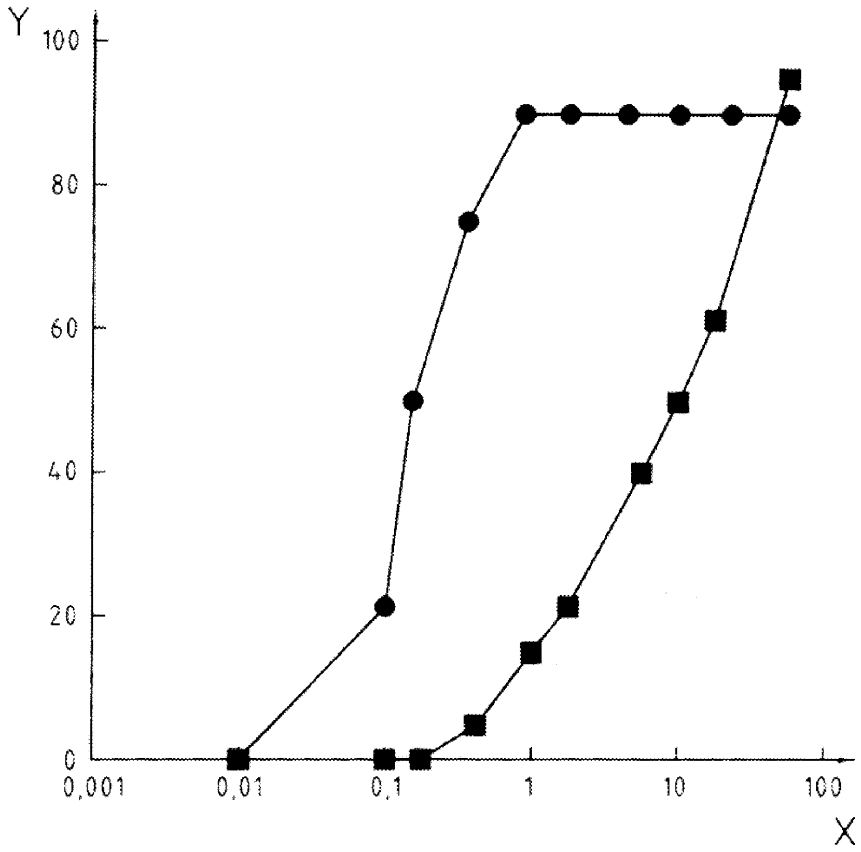
2 skābekļa elektrods

3 skābekļa mērierīce

▼**M6**

4. papildinājums

3. attēls. **Inhibīcijas līkņu piemērs**



Leģenda

X 3,5-dihlorofenola koncentrācija (mg/l)

Y inhibīcija (%)

■ heterotrofās elpošanas noteikta inhibēšanās, izmantojot nitrificējošas dūņas

● nitrifikācijas noteikta inhibēšanās, izmantojot nitrificējošas dūņas.

▼B

C.12. **BIODEGRADĀCIJA**

MODIFICĒTS *SCAS* TESTS

1. **METODE**

1.1. IEVADS

Šīs metodes mērķis ir ilgstošā laikposmā izvērtēt ūdenī šķīstošu, negaistošu organisku vielu maksimālo iespējamo bioloģiskās noārdīšanās spēju apstākļos, kad tās pakļauj relatīvi augstā koncentrācijā esošu mikroorganismu iedarbībai. Šajā laikā mikroorganismu dzīvotspēju uztur, ik dienas pievienojot to barotnei izgulsnētus notekūdeņus. (Iknedēļas brīvdienu laikā notekūdeņus var uzglabāt 4 °C temperatūrā. Cita iespēja ir izmantot sintētiskos notekūdeņus no ESAO apstiprinošā testa.)

Interpretējot rezultātus (skatīt 3.2. punktu), jāņem vērā tas, ka ir iespējama fizikālķīmiskā adsorbcija uz suspendētajām daļiņām.

Ilgstošā šķidrās fāzes aizturēšanas perioda (36 stundas) un nepastāvīgās barības vielu pievienošanas dēļ šajā testā netiek imitēti notekūdeņu attīrīšanas iekārtās esošie apstākļi. Ar dažādām testētajām vielām iegūtie rezultāti liecina par to, ka šim testam ir augsts biodegradācijas potenciāls.

Testa apstākļi ir ļoti labvēlīgi tādu mikroorganismu atlasei un/vai pielāgošanai, kas spēj noārdīt pārbaudāmo savienojumu. (Šo metodi var izmantot arī citiem testiem paredzētu aklimatizētu inokulātu ieguvei.)

Šajā metodē pārbaudāmo vielu maksimālās bioloģiskās noārdīšanās spējas novērtēšanai izmanto izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācijas mērījumus. Ieteicams IOO noteikt pēc paskābināšanas un izpūšanas, nevis kā kopējā un neorganiskā oglekļa starpību.

Vienlaikus izmantojot īpašu analīzes metodi, ir iespējams novērtēt vielas pirmējo noārdīšanos (sākotnējās ķīmiskās struktūras izzušanu).

Šī metode piemērojama tikai tādām organiskām pārbaudāmām vielām, kam testā izmantotajā koncentrācijā ir šādas īpašības:

— tās ir ūdenī šķīstošas (vismaz 20 mg izšķīdušā organiskā oglekļa uz litru),

— tām ir neliels tvaika spiediens,

— nav inhibējošas ietekmes uz baktērijām,

— to adsorbcija testa sistēmā ir nebūtiska,

— tās neizdalās no testa šķīduma putošanas dēļ.

Pārbaudāmā materiālā jānosaka organiskā oglekļa saturs.

▼B

Iegūto rezultātu interpretēšanā noder informācija par pārbaudāmā materiāla galveno sastāvdaļu relatīvo īpatsvaru, sevišķi tajos gadījumos, kad rezultāti ir skaitliski nelieli vai tuvi kritiskajai robežai.

Skaitliski nelielu rezultātu interpretēšanā un piemērotas testa koncentrācijas izvēlē var noderēt informācija par pārbaudāmās vielas toksicitāti mikroorganismiem.

1.2. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

C_T = pārbaudāmās vielas koncentrācija, izteikta ar esošā vai pievienotā organiskā oglekļa saturu izgulsnējušos notekūdeņos aerācijas perioda sākumā (mg/l),

C_t = testa šķīduma virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija aerācijas perioda beigās (mg/l),

C_c = kontrolanalīzes šķīduma virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija aerācijas perioda beigās (mg/l).

Šajā metodē ar biodegradāciju saprot organiskā oglekļa izzušanu. Biodegradāciju var izteikt šādi.

1. Vienā dienā pievienotā vielas daudzuma procentuālais zudums D_{da}:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad (1)$$

kur

D_{da} = vienā dienā pievienotā daudzuma noārdīšanās pakāpe.

2. Dienas sākumā esošā vielas kopējā daudzuma procentuālais zudums D_{ssd}:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad (2.\ a))$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad (2.\ b))$$

kur

D_{ssd} = dienas sākumā esošā vielas kopējā daudzuma noārdīšanās pakāpe;

ar indeksiem i un (i + 1) norāda mērījuma veikšanas dienu.

2. a) vienādība ieteicama tad, ja izplūdes IOO vērtība katru dienu ir citāda, bet 2. b) vienādību var izmantot tad, ja izplūdes IOO vērtība dažādās dienās ir relatīvi nemainīga.

▼B

1.3. STANDARTVIELAS

Dažos gadījumos, kad notiek jaunu vielu izpēte, var būt lietderīgi izmantot standartvielas, tomēr ieteikt konkrētu standartvielu nevar.

Dati par vairākiem gredzena testos vērtētiem savienojumiem (skatīt 1. papildinājumu) sniegti galvenokārt tādēļ, lai varētu regulāri veikt metodes kalibrēšanu un lai citas metodes izmantošanas gadījumā iegūtu salīdzināmus rezultātus.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

No notekūdeņu attīrīšanas iekārtām ņemtās aktīvās dūņas ievieto puspārtrauktās aktīvo dūņu darbības (*SCAS*) vienībā. Pievieno pārbaudāmo savienojumu un izgulsnētus sadzīves notekūdeņus un maisījumu aerē 23 stundas. Tad aerāciju pārtrauc, ļauj dūņām izgulsnēties un nolej šķīduma virsslāni.

Pēc tam aerācijas kamerā atlikušās dūņas sajauc ar nākamo pārbaudāmā savienojuma un notekūdeņu alikvoto daļu un atkārto visu ciklu.

Biodegradāciju vērtē, nosakot izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrāciju šķīduma virsslānī. Šo vērtību salīdzina ar to, kas iegūta, analizējot šķīdumu no kontrolanalīzes, kurā iepildīti tikai izgulsnētie notekūdeņi.

Ja izmanto kādu īpašu analītisku metodi, var mērīt biodegradācijas izraisītās izmaiņas sākotnējo molekulu koncentrācijā (pirmējā biodegradācija).

1.5. KVALITĀTES KRITĒRIJI

Šīs uz izšķīdušā organiskā oglekļa izzušanu balstītās metodes reproducējamība vēl nav noteikta. (Ir iegūti ļoti precīzi dati par stipri noārdāmu materiālu pirmējo biodegradāciju.)

Metodes jutību lielā mērā ietekmē tukšās analīzes mainīgums un – mazākā mērā – precizitāte, ar kādu katra cikla sākumā nosaka izšķīdušā organiskā oglekļa un šķīdumā esošā pārbaudāmā savienojuma koncentrāciju.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

Uzstāda atbilstīgu daudzumu tīru aerācijas vienību – var izmantot arī oriģinālo 1,5 litru *SCAS* testa vienību – un gaisa pievades caurulītes (1. attēls) katrai pārbaudāmai vielai un kontrolanalīzei. Testa vienībās piegādātajam saspiestajam gaisam, kuru attīra ar kokvilnas filtru, jābūt bez organiskā oglekļa piemaisījumiem un iepriekš piesātinātam ar ūdeni, lai mazinātu iztvaikošanas radītos zudumus.

Šķīduma maisījuma paraugu ar suspendēto daļiņu koncentrāciju no 1 līdz 4 g/l ņem no aktīvo dūņu iekārtām, kurās attīra galvenokārt sadzīves notekūdeņus. Katrai aerācijas vienībai vajadzīgi apmēram 150 ml šķīduma maisījuma.

▼B

Destilētā ūdenī sagatavo pārbaudāmās vielas standartšķīdumus; vajadzīgā organiskā oglekļa koncentrācija parasti ir 400 mg/l, un tas pārbaudāmā savienojumā nodrošina oglekļa koncentrāciju 20 mg/l katra aerācijas cikla sākumā, ja vien nenotiek biodegradācija.

Ja vielas toksicitāte attiecībā pret mikroorganismiem to ļauj, var izmantot augstākas koncentrācijas.

Izmēra organiskā oglekļa koncentrāciju standartšķīdumos.

1.6.2. *Testa apstākļi*

Tests jāveic no 20 līdz 25 °C temperatūrā.

Izmanto aerobos mikroorganismus augstā koncentrācijā (suspendēto daļiņu koncentrācija no 1 līdz 4 g/l), un efektīvais aiztures laiks ir 36 stundas. Oglekli saturošais materiāls notekūdeņu barotnē ekstensīvi oksidējas, un parasti tas notiek astoņu stundu laikā pēc katra aerācijas cikla sākuma. Pēc tam atlikušajā aerācijas periodā dūņas endogēni elpo, un šajā laikā vienīgais pieejamais substrāts ir pārbaudāmais savienojums, ja vien arī tas nav viegli metabolizējams. Šīs iezīmes apvienojumā ar ik dienas atkārtotu inokulāciju, ko veic tad, ja par barotni izmanto sadzīves notekūdeņus, nodrošina ļoti labvēlīgus apstākļus gan aklimatizācijai, gan ekstensīvai biodegradācijai.

1.6.3. *Testa veikšana*

Ņem aktīvo dūņu šķīduma maisījuma paraugu no piemērotām attīrīšanas iekārtām, kurās apstrādā galvenokārt sadzīves notekūdeņus, un līdz izmantošanai laboratorijā to tur aerobos apstākļos. Visas aerācijas vienības, kā arī kontrolvienību uzpilda ar 150 ml šķīduma maisījuma (ja izmanto oriģinālo *SCAS* testa vienību, tad šeit norādītie tilpumi jāreizina ar 10) un sāk aerāciju. Pēc 23 stundām aerāciju pārtrauc un ļauj dūņām 45 minūtes nogulsnēties. Pēc kārtas atver katra trauka krānu un nolej pa 100 ml šķīduma virsslāņa. Tieši pirms izmantošanas ņem izgulsnējušos sadzīves notekūdeņu paraugu un katrā aerācijas vienībā atlikušajām dūņām pievieno pa 100 ml no šā parauga. Atsāk aerāciju. Šajā stadijā pārbaudāmos materiālus nepievieno un vienības ik dienu papildina ar sadzīves notekūdeņu devu, kamēr šķīduma virsslānis pēc izgulsnēšanās kļūst dzidrs. Parasti tas aizņem ne vairāk kā divas nedēļas, un līdz šim laikam šķīduma virsslānī izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija katra aerācijas cikla beigās stabilizējas konkrētā līmenī.

Minētā laika posma beigās atsevišķajos traukos izgulsnējušās dūņas samaisa un katrā vienībā pievieno 50 ml no šādi iegūtā dūņu maisījuma.

Kontrolvienībās pievieno 95 ml izgulsnējušos notekūdeņu un 5 ml ūdens un testa vienībās pievieno 95 ml izgulsnējušos notekūdeņu un 5 ml attiecīgā pārbaudāmā savienojuma standartšķīduma (400 mg/l). Atsāk aerāciju, kuru turpina 23 stundas. Pēc tam ļauj dūņām 45 minūtes nogulsnēties, nolej šķīduma virsslāni un tajā nosaka izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrāciju.

Iepriekš aprakstīto uzpildīšanas un noliešanas procedūru atkārto katru dienu visā testa laikā.

▼B

Pirms izgulsnēšanas var būt vajadzīgs notīrīt vienību sienas, lai novērstu cieto daļiņu uzkrāšanos virs šķidruma līmeņa. Lai novērstu nevēlamu savstarpēju sajaukšanos, katrai vienībai lieto savu skrāpi vai suku.

Ideālā gadījumā izšķīdušo organisko oglekli šķīduma virsslānī nosaka katru dienu, lai arī ir pieļaujams veikt ne tik biežas analīzes. Pirms analizēšanas šķīdumus izfiltrē caur mazgātiem 0,45 μn membrānfiltriem vai centrifugē. Membrānfiltri ir derīgi tad, ja tie visos filtrēšanas etapos nodrošina slāpekļa necaurlaidību un neabsorbē pārbaudāmo vielu. Parauga temperatūra centrifugēšanas laikā nedrīkst pārsniegt 40 °C.

Testa ilgums attiecībā uz savienojumiem, kuru bioloģiskā degradācija ir slikta vai kuri bioloģiski nenoārdās nemaz, nav noteikts, taču pieredze liecina, ka parasti tam vajadzētu ilgt vismaz 12 nedēļas un tomēr ne vairāk kā 26 nedēļas.

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

Testa vienību un kontrolanalīžu vienību šķīdumu virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa vērtības attēlo grafiski attiecībā pret laiku.

Biodegradācijas gadījumā vielas koncentrācija testa vienībā tuvinās vielas koncentrācijai kontrolanalīzē. Pēc tam, kad abu minēto koncentrāciju starpība trijos secīgos mērījumos ir palikusi nemainīga, veic vēl tik daudz turpmāku mērījumu, cik vajadzīgs datu statistiskai apstrādei, un aprēķina pārbaudāmās vielas procentuālo biodegradāciju (D_{da} vai D_{ssd}, skatīt 1.2. punktu).

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— visas ziņas par notekūdeņu veidu, izmantoto vienību veidu un eksperimentālajiem rezultātiem attiecībā uz testēto vielu, standartvielu, ja tāda ir izmantota, un tukšo analīzi,

— temperatūra,

— degradācijas līkne ar aprakstu, aprēķina veids (skatīt 1.2. punktu),

— aktīvo dūņu un notekūdeņu ievākšanas datums un vieta, pielāgojumu statuss, koncentrācija u. c.,

— zinātnisks pamatojums visām testa metodes izmaiņām,

— paraksts un datums.

▼B

3.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Tā kā ar šo metodi pārbaudāmās vielas nav viegli biodegradējamas, tad tas IOO samazinājums, kas noticis vienīgi biodegradācijas dēļ, parasti izpaužas pakāpeniski, vairāku dienu vai nedēļu laikā, izņemot gadījumus, kad aklimatizācija ir pēkšņa, uz ko norāda krass koncentrācijas samazinājums pēc dažām nedēļām.

Tomēr dažreiz var manāmi izpausties fizikālķīmiskā adsorbcija; par to liecina pilnīga vai daļēja pievienotā IOO izzušana jau pašā sākumā. Turpmāk notiekošais ir atkarīgs no tādiem faktoriem kā izplūdē esošo suspendēto daļiņu adsorbcijas pakāpe un koncentrācija. Parasti IOO koncentrāciju starpība kontrolanalīzes un pārbaudāmās vielas šķīduma virsslānī, salīdzinot ar sākotnējo zemo vērtību, pakāpeniski pieaug un pēc tam šī starpība saglabājas nemainīga visu atlikušo eksperimenta laiku, ja vien nenotiek aklimatizācija.

Lai nodalītu biodegradāciju (vai daļēju biodegradāciju) no adsorbcijas, jāveic turpmāki testi. To var veikt vairākos veidos, bet vispārliecinošākais ir izmantot šķīduma virsslāni vai dūņas par inokulātu galvenajā sarakstā iekļautā testā (vēlams – respirometriskā testā).

Pārbaudāmās vielas, kam šajā testā raksturīga augsta, neadsorbējoša IOO samazināšanās, uzskatāmas par potenciāli bioloģiski noārdāmām. Daļēja neadsorbējoša samazināšanās norāda uz to, ka ķīmiskā viela vismaz daļēji ir bioloģiski noārdāma.

Vāju IOO samazināšanos vai tās trūkumu var būt izraisījusi pārbaudāmās vielas inhibējošā iedarbība uz mikroorganismiem, un to var atklāt arī līze un dūņu zudums, kā rezultātā šķīduma virsslānis ir duļķains. Tests jāatkārto ar zemāku pārbaudāmās vielas koncentrāciju.

Lielāku jutību iespējams sasniegt, izmantojot savienojumam specifisku analīzes metodi vai ar radioaktīvo oglekli ^{14}C marķētu pārbaudāmo vielu. Ar ^{14}C marķēta pārbaudāmā savienojuma gadījumā to, ka ir notikusi biodegradācija, apstiprina $^{14}CO_2$ atgūšana.

Ja rezultāti raksturo arī primāro biodegradāciju, tad iespēju robežās jāizskaidro ķīmiskās struktūras izmaiņas, kas izraisa reakcijas zudumu sākotnējā pārbaudāmā vielā.

Analīzes metodes validācija jānorāda kopā ar tukšajā analīzē iegūto rezultātu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

1. papildinājums

SCAS tests: rezultātu piemērs

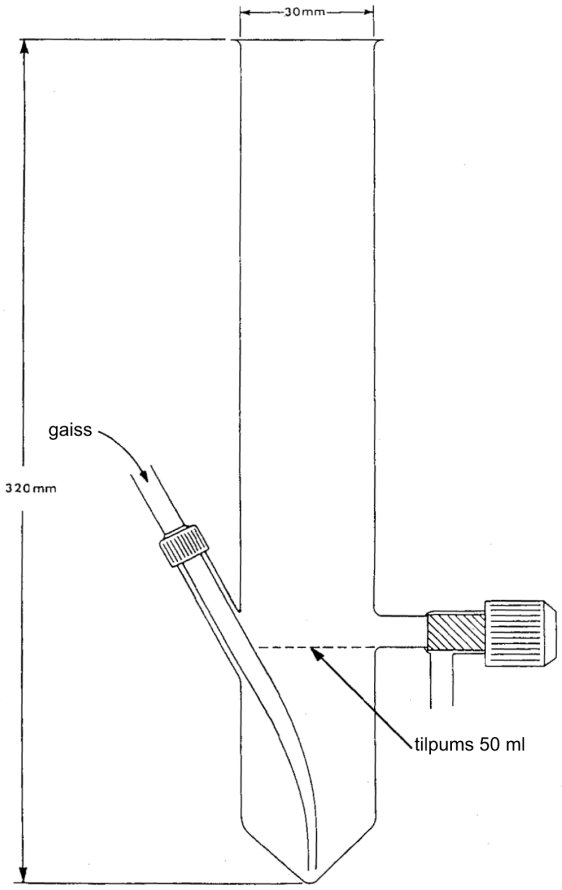
Viela	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Biodegradācijas procentuālais daudzums, D_{da}	Testa ilgums (dienas)
4-acetilaminobenzolsulfonāts	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilēnbenzolsulfonāts	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenols	16,9	0,8	95,3	40
Dietilēnglikols	16,5	0,2	98,8	40
Anilīns	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentāntetrakarboksilāts	17,9	3,2	81,1	120

▼B

2. Papildinājums

Testa iekārtas piemērs

1. attēls



▼M7

C.13. **BIOAKUMULĀCIJA ZIVJU ORGANISMĀ: ŪDENSEKSPOZĪCIJA UN UZTUREKSPOZĪCIJA**

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 305 (2012). Šai testēšanas metodes pārskatīšanai ir divējāds galvenais mērķis. Pirmkārt, tajā paredzēts iekļaut uzturiskās bioakumulācijas ([1]) testu, kas ir piemērots tam, lai noteiktu ūdenī ļoti slikti šķīstošu vielu bioakumulācijas potenciālu. Otrkārt, ar to paredzēts izveidot testēšanas metodi, kurā attiecīgā gadījumā dzīvnieku labturības iemeslu dēļ izmanto mazāk zivju un kura izmaksu ziņā ir lietderīgāka.

Gados, kopš pieņemta konsolidētā testēšanas metodes C.13. (1), ir pārbaudīts daudz vielu un gan laboratorijas, gan regulatīvās iestādes ir ieguvušas vērā ņemamu pieredzi. Tas ir radījis pārliecību, ka, izpildot specifiskus kritērijus (sal. ar 88. punktu) šo testu var padarīt nesarežģītāku un ka ir iespējama daudzpakāpju pieeja. Pieredze arī liecina, ka rezultātus var stipri ietekmēt tādi bioloģiski faktori kā augšana un zivju organisma lipīdsturs, un tie var būt ņemami vērā. Turklāt ir atzīts, ka var nebūt tehniski iespējams testēt ūdenī ļoti slikti šķīstošas vielas. Turklāt attiecībā uz vielām, kuras ūdensvidē ļoti slikti šķīst ūdenī, ūdenseksponētība var nebūt tik svarīga kā uzturekspozīcija. Rezultātā ir izstrādāta testēšanas metode, kurā zivis tiek eksponētas ar uzturu (sal. ar 7.–14. punktu, 97. punktu un turpmākiem punktiem). Uzturekspozīcijas tests tika validēts (starplaboratoriju salīdzināšana) 2010. gadā (51).

Galvenās pārmaiņas ir šādas.

— Ja ir varbūtīgi, ka bioloģiskās koncentrēšanās faktors (*BCF*) nav atkarīgs no testējamās koncentrācijas, var uzskatīt, ka pietiek ar vienas testējamās koncentrācijas testēšanu.

— Plāns minimizētam ūdenseksponētības testam, kurā, izpildot specifiskus kritērijus, iespējams izmantot mazāku paraugošanas punktu skaitu.

— Jāmēra zivju lipīdsaturs, lai *BCF* varētu izteikt uz lipīdsatura 5 % bāzes.

— Papildus stacionārās fāzes BCF aplēsei lielāka nozīme piešķirta kinētiskā *BCF* aplēsei (ja tā iespējama).

— Ja salīdzinājumā ar ūdenseksponētības testu par piemērotāku uzskata uzturekspozīcijas testu, tas tiks ierosināts atsevišķām vielu grupām.

— Zivju svars jānosaka tā, lai BCF_k būtu iespējams koriģēt ar augšanas izraisītu atšķaidījumu.

Pirms veikt jebkādus bioakumulācijas testus, par testējamo ķimikāliju jābūt noskaidrotai šādai informācijai:

(a) analītiskā paņēmiena jutība gan attiecībā uz testējamās vielas, gan tās varbūtējo metabolītu koncentrācijas mērīšanu audos un ūdenī vai barībā (sal. ar 65. punktu);

(b) šķīdība ūdenī [TM A.6.; (2)]; lai iegūtu ticamu vērtību, tā jānosaka saskaņā ar metodi, kas atbilst šķīdības (aplēstajam) diapazonam. Hidrofobām vielām tā parasti būs kolonnu eluēšanas metode;

([1]) Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

▼M7

(c) n-oktanola–ūdens sadalījuma koeficients K_{OW} ([1]) [TM A.8. (4), A.24. (5), A.23. (6)]; vai cita piemērota informācija par sadalīšanās uzvedību (piemēram, sorbcija lipīdos, K_{OC}); lai iegūtu ticamu vērtību, koeficients jānosaka saskaņā ar K_{OW} (aplēstajam) diapazonam atbilstošu metodi. Hidrofobām vielām tā parasti būs lēnās maisīšanas metode [TM A.23. (6)];

(d) vielas stabilitāte ūdenī (hidrolīze [TM C.7. (7)];

(e) vielas stabilitāte pārtikā (īpaši ja izraugās uzturekspozīcijas testa pieeju);

(f) informācija par testa starojuma apstākļiem relevantu fototransformāciju (8);

(g) virsmas spraigums (t. i., vielām, kurām nevar noteikt log K_{OW}) [TM A.5. (9)];

(h) tvaika spiediens [TM A.4. (10)];

(i) jebkāda informācija par biotisku vai abiotisku noārdīšanos ūdenī, piemēram (bet ne tikai), attiecīgā gadījumā pilnā bionoārdāmība [TM C.4., I–VII daļa (11), C.29. (12)];

(j) informācija par metabolītiem: struktūra, log K_{OW}, attiecīgā gadījumā veidošanās un noārdīšanās;

(k) skābes disociācijas konstante (pK_a) vielām, kuras var jonizēties. Ja nepieciešams, testējamā ūdens pH jākoriģē, lai gadījumā, ja attiecībā uz zivju sugu tā var rīkoties, nodrošinātu, ka viela testā ir nejonizētā veidā.

Neatkarīgi no izvēlētās ekspozīcijas metodes vai paraugošanas shēmas šī testēšanas metode apraksta procedūru, kā raksturotu vielas potenciālu bioakumulācijai zivju organismā. Kaut arī vēlams izmantot caurplūdes testa režīmus, ja ir izpildīti validitātes kritēriji, pieļaujami ir semistatiski režīmi (sal. ar 24. un 113. punktu). Izmantojot uzturekspozīcijas sistēmu nav nepieciešama tam, lai saglabātu testētās vielas koncentrāciju ūdenī, bet palīdzēs uzturēt pietiekamas izšķīdušā skābekļa koncentrācijas, nodrošināt ūdens tīrību un likvidēs ietekmi, ko rada, piemēram, izdalīšanās produkti.

Neatkarīgi no tā, kuru testēšanas metodi izraugās, šī testēšanas metode pietiekami detalizēti informē par šā testa veikšanu, vienlaicīgi atvēlot pietiekamu brīvību eksperimenta struktūru pielāgot konkrētu laboratoriju apstākļiem un mainīgajām testējamo vielu īpašībām. Ūdensekspozīcijas testu vislabāk izmantot stabilām organiskām vielām, kuru log K_{OW} vērtības ir no 1,5 līdz 6,0 (13), bet to var izmantot arī ļoti hidrofobām vielām (log K_{OW} > 6,0), ja iespējams pierādīt, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija ūdenī ir stabila un ka ķimikālija pilnīgi izšķīdusi. Ja nav iespējams pierādīt, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija ūdenī ir stabila, ūdensekspozīcijas pētījums nav piemērots un tāpēc vielas testēšanai ar zivīm būtu jāizmanto uzturpieeja (kaut arī uzturtesta rezultātu interpretācija un izmantošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma). Iepriekšējas aplēses

([1]) Dažreiz norāda ar P_{OW}; nosaka ar kolbu kratīšanas metodi saskaņā ar TM A.8. (4), *HPLC* metodi saskaņā ar TM A.24. (5) un lēnās maisīšanas metodi saskaņā ar TM A.23. (6). Lai noteiktu log K_{OW}, atsevišķos gadījumos izmanto ģeneratora-kolonnas paņēmienu. Ir pieejami daži pētījumi, kur izmantots šis paņēmiens, lielākoties polihlorbifeniliem un dibenzodioksīniem (piemēram, *Li and Doucette*, 1993. gads) (3). Vielām, kuras var jonizēties, log K_{OW} jānorāda attiecībā uz nejonizēto formu.

▼M7

par biokoncentrēšanās koeficientu (*BCF*, ko dažreiz apzīmē ar K_B) organiskām vielām, kuru log K_{OW} vērtības ir līdz pat 9,0, var iegūt, izmantojot *Bintein et al.* vienādojumu (14). Tādām stipri hidrofobām vielām biokoncentrēšanās koeficienta priekšaplēšu vērtības var pārsniegt stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficienta (BCF_{SS}) vērtību, kuru paredzēts iegūt laboratorijas eksperimentos, jo īpaši tad, ja priekšaplēsei izmantots lineārs modelis. Bioakumulācijas potenciālu raksturo tādi parametri kā uzņemšanas ātruma konstante (k_1), zuduma ātruma konstantes, arī izvadīšanas ātruma konstante (k_2), stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{SS}), kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_K) un uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (*BMF*) ([1]).

Radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas var atvieglot ūdens, pārtikas un zivju paraugu analīzi, un tās var izmantot, lai noteiktu, vai būs jāidentificē un kvantitatīvi jānosaka metabolīti. Ja mēra tikai radioaktīvo atlieku kopējo daudzumu (piemēram, sadedzinot vai šķīdinot audus), *BCF* vai *BMF* ir uz pamatvielas, visu nesadalījušos metabolītu un asimilētā oglekļa kopējās bāzes. Līdz ar to uz radioaktīvo atlieku kopdaudzumu balstītas *BCF* un *BMF* vērtības nevar tieši salīdzināt ar *BCF* un *BMS*, kas iegūti, specifiski analizējot tikai pamatvielu. Lai konstatētu *BCF* vai *BMF* uz pamatvielas bāzes, pētījumos ar radioaktīvu iezīmēšanu pirms analīzes var izmantot atdalīšanas (separācijas) procedūras, piemēram, *TLC*, *HPLC* vai *GC* ([2]). Ja *BCF* vai *BMF* bāzei jābūt nevis radioaktīvi iezīmētajam kopējam atlikumam, bet gan pamatvielas koncentrācijai zivs organismā, ar atdalīšanas paņēmieniem jāidentificē pamatviela un attiecīgie metabolīti un tie kvantitatīvi jānovērtē ([3]) (sal. ar 65. punktu). Vēl ir iespējams, analizējot un identificējot atliekas audos, ar bioakumulācijas pētījumu apvienot zivju metabolisma vai *in vivo* sadalījuma pētījumu. Ar attiecīgiem instrumentiem var prognozēt metabolizēšanās iespējamību (piemēram, ESAO *QSAR* instrumentu kopumu (15) un aizsargātajām *QSAR* programmām).

Lēmums par to, vai veikt ūdensekspozīcijas vai uzturekspozīcijas testu un kāda būs tā struktūra, jābalsta uz 3. punktā minētajiem faktoriem, kas ņemti vērā kopā ar attiecīgo tiesisko regulējumu. Piemēram, attiecībā uz vielām, kurām ir liels log K_{OW}, bet kurām attiecībā uz pieejamo analītisko paņēmienu jutību joprojām vērojama vērā ņemama šķīdība ūdenī, vispirms jāapsver, vai neveikt ūdensekspozīcijas testu. Tomēr pastāv iespēja, ka informācija par šo hidrofobo vielu šķīdību ūdenī nav galīga, tādēļ, pirms lemj, kuru testēšanas metodi izmantot, jāizpēta iespēja sagatavot ūdensekspozīcijas pētījumā izmantojamas stabilas, mērāmas koncentrācijas ūdens šķīdumā (stabilas emulsijas nav atļautas) (16). Spriežot pēc tādiem kritērijiem kā šķīdība ūdenī un oktanola-ūdens sadalījuma koeficienta "robeža", konkrētus preskriptīvas norādījumus par izmantojamo metodi sniegt nav iespējams, jo iepriekš norādīto iemeslu dēļ metodes izmantojamību var būtiski ietekmēt citi faktori (analītiskie paņēmieni, noārdīšanās, adsorbcija, u. c.). Tomēr par 5 augstāks log K_{OW} un šķīdība ūdenī, kas mazāka par ~0,01 – 0,1 mg/l, iezīmē tādu vielu diapazonu, kuras testēt ar ūdensekspozīciju var būt arvien grūtāk.

Jāapsver, kādi citi faktori, varētu ietekmēt testa izvēli, arī vielas potenciāls adsorbēties testēšanas tvertnēs un aparātā, tās stabilitāte ūdens šķīdumā attiecībā pret tās stabilitāti zivju barībā (17) (18) utt.

Informācija par šādiem praktiskiem aspektiem var būt pieejama no citiem pabeigtiem ūdensekspozīcijas pētījumiem. Papildu informācija par to, kā vērtēt aspektus, kas saistās ar bioakumulācijas pētījumu veikšanu, ir pieejama literatūrā (piemēram, (19)).

Vielām, kurām ir tāda šķīdība vai attiecībā uz kurām ir tāda iespēja uzturēt koncentrāciju ūdenī un šo koncentrāciju tā analizēt, ka ir iespējams realizēt ūdensekspozīcijas metodi, biokoncentrēšanās potenciālu ieteicams noteikt ar to. Jebkurā gadījumā jāpārliecinās, ka izmantojamā(-s) ūdensekspozīcijas koncentrācija(-s) ir testa vides ūdens šķīdības diapazonā. Lai uzturētu izšķīdinātās testējamās vielas koncentrācijas stabilitāti, ir iespējams izmantot dažādas metodes,

([1]) Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

([2]) *TLC*: plānslāņa hromatogrāfija; *HPLC*: augstspiediena šķidruma hromatogrāfija; *GC*: gāzu hromatogrāfija.

([3]) Dažos tiesiskajos regulējumos metabolītu analīze var būt obligāta, ja tiek ievēroti konkrēti nosacījumi (*sal.* 65. punkts).

▼M7

piemēram, izejšķīdumus vai pasīvās dozēšanas sistēmas (piemēram, kolonnu eluēšanas metodes) izmantošana, ja vien ir iespējams pierādīt, ka ir iespējams uzturēt stabilas koncentrācijas un ka testa vide salīdzinājumā ar 27. punktā ieteikto nemainās.

Attiecībā uz stipri hidrofobām vielām (log K_{OW} > 5 un ar šķīdību zem ~ 0,01-0,1 mg/l) ūdensekspozīcijas testus veikt var būt arvien grūtāk. Ierobežojumus var radīt tas, ka ūdens koncentrāciju (piemēram, ekspozīcijas tvertņu stikla sorbcijas dēļ vai tāpēc, ka notiek strauja uzņemšana zivju organismā) nav iespējams uzturēt līmenī, ko uzskata par pietiekami nemainīgu, vai ka jāizmanto tik zemas koncentrācijas ūdenī, ka tās atrodas kvantitatīvās noteikšanas analītiskās robežas diapazonā vai zem tā ([1]). Šīm stipri hidrofobajām vielām ieteicams veikt barībekspozīcijas testu, ja vien tas tests sader ar attiecīgo tiesisko regulējumu un riska novērtējuma vajadzībām.

Attiecībā uz virsmaktīvām vielām, ņemot vērā to īpašības, jāapsver, vai tām neizmantot ūdens biokoncentrēšanās testu, pretējā gadījumā piemērotāks varētu būt uzturpētījums. Virsmaktīvas vielas ir virsmaktīvi aģenti, kas mazina spraigumu starp diviem šķidrumiem. Sava amfifīliskā rakstura dēļ (t. i., tie satur gan hidrofīlisku, gan hidrofobisku daļu) tās akumulējas tādās saskares šķirtnēs kā ūdens un gaiss, ūdens un pārtika un stikla sienas, un tāpēc ir grūtāk noteikt to koncentrāciju ūdenī.

Ar uzturtestu iespējams apiet dažus jautājumus, kas saistīti ar tādu sarežģītu maisījumu ekspozīciju, kuru sastāvdaļām atšķiras robeža šķīdībai ūdenī, tādējādi ka salīdzināma eksponētība visiem maisījuma komponentiem ar to ir varbūtīgāka nekā ar ūdenseksponētības metodi (*sal.* (20)).

Jāpiebilst, ka uzturpieejā tiek iegūts uzturisks biomagnifikācijas koeficients (*BMF*), nevis biokoncentrēšanās faktors (*BCF*) ([2]). Ir pieejas, kā no uzturpētījumā iegūtiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K) (kā aprakstīts 8. papildinājumā), taču šīs pieejas jāizmanto piesardzīgi. Kopumā šajās pieejās pastāv pieņēmums par pirmās pakāpes kinētiku un tās var izmantot vienīgi noteiktām savienojumu grupām. Tās izmantot virsmaktīvām vielām ir mazvarbūtīgi (sk. 12. punktu).

Minimizēta ūdensekspozīcijas testa izkārtojums, kurā paredzēts mazāk paraugošanas punktu un kuram ir mērķis samazināt dzīvnieku skaitu un/vai resursu apjomu (sal. ar 83. punktu un turpmākiem punktiem), jāizmanto tikai vielām, attiecībā uz kurām ir iemesls paredzēt, ka uzņemšana un izvadīšana aptuveni atbildīs pirmās pakāpes kinētikai (t. i., kopumā nejonizētas organiskās vielas, sal. ar 88. punktu).

C.13. – I: **ZIVJU ŪDENSEKSPOZĪCIJAS BIOKONCENTRĒŠANĀS TESTS**

TESTA PRINCIPS

Šim testam ir divas fāzes: ekspozīcijas fāze (uzņemšana) un pēcekspozīcijas fāze (izvadīšana). Uzņemšanas fāzes laikā vienas sugas zivju grupu eksponē testējamai vielai pie vienas vai vairākām koncentrācijām, kas izraudzītas atkarībā no testējamās vielas īpašībām (sal. ar 49. punktu). Pēc tam zivis izvadīšanas fāzē pārvieto vidi, kas nesatur testējamo vielu. Izvadīšanas fāze vajadzīga vienmēr, ja vien uzņemšanas fāzē uzņemtais vielas daudzums nav maznozīmīgs. Abās testa

([1]) Kopumā ūdenī izmērītajām koncentrācijām uzņemšanas fāzē vismaz par vienu lieluma kārtu jāpārsniedz kvantitatīvās noteikšanas robeža, lai pētījuma izvadīšanas fāzē attiecībā uz organismā esošajām vielām būtu iespējams izmērīt vairāk nekā vienu pussabrukšanas periodu.

([2]) Definīcijas un mērvienības skatīt 1. papildinājumā.

▼M7

fāzēs kontrolē testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā/uz tā virsmas (vai specifiskos organisma audos). Papildus divām eksponētajām grupām identiskos apstākļos, izņemot to, ka nav pievienota testējamā viela, tur zivju kontrolgrupu, lai ar attiecīgo kontrolgrupu varētu salīdzināt biokoncentrēšanas testā novērojamās varbūtējās negatīvās ietekmes un iegūt testējamās vielas fona koncentrācijas ([1]).

Ūdensekspozīcijas testā uzņemšanas fāze parasti ilgst 28 dienas. Tās ilgumu nepieciešamības gadījumā var paildzināt (sal. ar 18. punktu) vai saīsināt, ja tiek pierādīts, ka stacionārā fāze ir sasniegta agrāk (definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā). Uzņemšanas fāzes ilgumu un laiku līdz stacionārai fāzei var prognozēt, izmantojot 5. papildinājumā sniegtos vienādojumus. Izvadīšanas fāzi sāk tad, kad zivis vairs nav eksponētas testējamajai vielai, pārvietojot zivis uz tādu pašu vidi, taču bez testējamās vielas klātbūtnes tīrā traukā. Ja iespējams, biokoncentrēšanās koeficientu vēlams aprēķināt gan kā koncentrēšanās koeficientu zivju organismā (C_f), gan ūdenī (C_w) stacionārajā fāzē (BCF_{SS}; definīciju sk. 1. papildinājumā), gan arī kā kinētisku biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K; definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā), kas tiek aplēsts kā uzņemšanas ātruma konstantes (k_1) un izvadīšanas ātruma konstantes (k_2) attiecība, pieņemot, ka būs pirmās pakāpes kinētika ([2]).

Ja 28 dienu laikā stacionāro fāzi nesasniedz, aprēķina *BCF*, izmantojot kinētisko pieeju, (sal. ar 38. punktu) vai arī uzņemšanas fāzi var paildzināt. Ja tāpēc, lai tiktu sasniegta stacionārā fāze, uzņemšanas fāze nepraktiski ieilgst (sal. ar 5. papildinājuma 37. un 38. punktu), vēlams izmantot kinētisko pieeju. Pārmaiņus attiecībā uz stipri hidrofobām vielām jāapsver, vai neveikt uztura pētījumu ([3]), ja vien uztura tests atbilst attiecīgajam tiesiskajam regulējumam.

Uzņemšanas ātruma konstanti, izvadīšanas (zuduma) ātruma konstanti (vai konstantes, ja izmanto sarežģītākus modeļus), biokoncentrēšanas koeficientu (stacionāro un/vai kinētisko) un, ja iespējams, ticamības robežas katram no šiem parametriem aprēķina, izmantojot modeli, kas vislabāk apraksta izmērītās testējamās vielas koncentrācijas zivju organismā un ūdenī (sal. ar 5. papildinājumu).

Zivs masas pieaugums testa laikā samazinās testējamās vielas koncentrāciju augošās zivīs (tā saucamais "augšanas izraisīts atšķaidījums"), tāpēc kinētiskais *BCF* atbilstoši augšanai jākoriģē, jo pretējā gadījumā tas tiks novērtēts par zemu (sal. ar 72. un 73. punktu).

BCF ir balstīts uz kopējo koncentrāciju zivju organismā (*t. i.*, uz zivs kopējo slapjsvaru). Tomēr, ja zivis ir pietiekami lielas vai arī ja tās var sadalīt ēdamajā daļā (fileja) un neēdamajā daļā (iekšējie orgāni), īpašiem mērķiem var izmantot specifiskus audus vai orgānus (piemēram, muskuļus, aknas). Tā kā daudzām organiskām vielām ir skaidri izteikta sakarība starp biokoncentrēšanas potenciālu un hidrofobitāti, attiecīga sakarība pastāv arī starp tauku saturu testa zivju organismā un šādu vielu novēroto biokoncentrēšanos. Tādējādi, lai testa rezultātos

([1]) Lielākajai daļai testējamo vielu ideālā gadījumā nevajadzētu būt detektējamām kontroles ūdenī. Fona koncentrācijām būtu jāattiecas tikai uz dabiskas izcelsmes materiāliem, (piemēram, dažiem metāliem) un vielām, kuras vidē ir plaši pieejamas.

([2]) Ja acīmredzami netiek novērota pirmās pakāpes kinētika, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru *5. papildinājumā*) un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

([3]) Ja biokoncentrēšanās testā novērojama slikta šķīdība ūdenī, mazas ekspozīcijas koncentrācijas var mazināt uzņemšanu, turpretī ar barības testu iespējams panākt daudz lielākas ekspozīcijas koncentrācijas.

▼M7

vielām ar augstu lipofilitāti (*t. i.*, log K_{OW} > 3) šādas mainības avotu samazinātu, biokoncentrēšanās zivju organismā papildus tieši pētījumā iegūtajam rādītājam jāizsaka kā normalizēta zivij, kuras organismā lipīdsaturs ir 5 % (uz visa ķermeņa slapjsvara bāzes). Tas vajadzīgs, lai būtu bāze, ko var izmantot, lai savstarpēji salīdzinātu par dažādām vielām un/vai testa sugām iegūtus rezultātus. Lipīdsaturu 5 % izmanto ļoti plaši, jo tas raksturo vidējo lipīdsaturu šajā testēšanas metodē izmantot zivju [sugu] organismā (21).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Papildus Ievadā (3. punkts) norādītajām testējamās vielas īpašībām nepieciešama arī tāda informācija kā toksiskums testā izmantojamajai zivju sugai, vēlams, asimptotiskā LC_{50} (*t. i.*, no laika neatkarīga), un/vai no ilglaicīgos testos ar zivīm aplēstais toksiskums (piemēram, TM C.47. (22), C.15. (23) un C.14. (24)).

Lai kvantitatīvi noteiktu vielu testējamos šķīdumos un bioloģiskajā materiālā, jābūt pieejamai piemērotai analītiskai metodei ar zināmu pareizību, precizitāti un jutību, kā arī informācijai par paraugu sagatavošanu un glabāšanu. Jābūt zināmai arī testējamās vielas analītiskās kvantitatīvās noteikšanas robežai gan ūdenī, gan zivju audos. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu testējamo vielu, tai jābūt ar augstāko tīrību (piemēram, vēlams > 98 %) un jābūt zināmai ar piemaisījumiem saistītajai radioaktivitātes procentuālajai daļai.

TESTA VALIDITĀTE

Lai tests būtu valīds, piemēro šādus nosacījumus:

Ūdens temperatūras mainība ir mazāka par ± 2°C, jo lielas novirzes var ietekmēt uzņemšanai un izvadīšanai būtiskus bioloģiskus parametrus, kā arī dzīvniekiem izraisīt stresu.

Izšķīdušā skābekļa koncentrācija nav mazāka par 60 % piesātinājuma.

Testējamās vielas koncentrāciju kamerās uztur ± 20 % robežās no uzņemšanas fāzes laikā izmērītās vidējās vērtības.

Testējamās vielas koncentrācija nesasniedz tās ūdenssšķīdības robežu, ierēķinot to, kā faktisko šķīdību var ietekmēt testa ūdens ([1]).

Testa beigās mirstība vai citas negatīvas ietekmes/slimības ne kontroles, ne apstrādātajām zivīm nepārsniedz 10 %; ja tests ilgst vairākas nedēļas vai mēnešus, nāve vai cita veida negatīva ietekme abās zivju kopās nedrīkst pārsniegt 5 % mēnesī un kopumā nedrīkst pārsniegt 30 %. Ja testgrupās un kontrolgrupās paraugoto zivju vidējais augšanas ātrums būtiski atšķiras, tas var liecināt par toksisku testējamās vielas ietekmi.

STANDARTVIELAS

Ja vajag pārbaudīt eksperimenta procedūru (piemēram, ja laboratorijai nav iepriekšējas pieredzes testa veikšanā vai ir mainīti eksperimenta apstākļi), var būt lietderīgi izmantot standartvielas ar zināmu biokoncentrēšanās potenciālu un zemu metabolizēšanos.

([1]) Lai noteiktu attiecīgas ekspozīcijas koncentrācijas, vairākkomponentu vielām, *UVCB* un maisījumiem jāņem vērā katra attiecīgā komponenta šķīdība ūdenī.

▼M7

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

Jācenšas nevienā aprīkojuma daļā neizmantot materiālus, kas var šķīst, sorbēties vai izskaloties un kas var nelabvēlīgi ietekmēt zivis. Var izmantot no ķīmiski inerta materiāla izgatavotas taisnstūrainas vai cilindriskas standarttvertnes, kurām ir pietiekama, noslogojumam (sal. ar 43. punktu) atbilstoša ietilpība. Mīkstas plastmasas caurulītes jāizmanto minimāli. Jāizmanto politetrafluoretilēna, nerūsošā tērauda un/vai stikla caurulītes. Pieredze rāda, ka tādām testējamām vielām ar augstu adsorbcijas koeficientu kā sintētiskie piretroīdi var būt jāizmanto kvarca stikls. Tādās situācijās aprīkojums pēc izmantošanas jālikvidē. Ja pirms testa organismu iesaistīšanas prasīts pierādīt, ka tiek saglabātas stabilas ekspozīcijas koncentrācijas, testa sistēmas vēlams tik ilgi, cik vajadzīgs, eksponēt tādām testējamās vielas koncentrācijām, kas tiks izmantotas pētījumā.

Ūdens

Testos parasti lieto dabisko ūdeni, un tā ieguves avotam jābūt nepiesārņotam un nemainīgas kvalitātes. Tomēr, lai nodrošinātu nemainīgu kvalitāti, piemērotāks var būt rekonstituēts ūdens (*t. i.*, demineralizēts ūdens, kam zināmos daudzumos pievienoti konkrēti mikroelementi). Atšķaidīšanas ūdenim, kas ir pirms ievietošanas testa traukā ar testējamo vielu sajaukts ūdens (sal. ar 30. punktu), jābūt tādas kvalitātes, lai izraudzītās zivju sugas visa aklimatizācijas un testēšanas perioda laikā varētu izdzīvot, neuzrādot nekādas anormālas izskata vai uzvedības pazīmes. Ideālā gadījumā jāpierāda, ka testā izmantotās sugas atšķaidīšanas ūdenī var dzīvot, augt un vairoties (piemēram, laboratorijas kultūras vai dzīvescikla toksiskuma testā). Atšķaidīšanas ūdens jāraksturo vismaz ar pH, cietību, kopējo cieto vielu saturu, kopējo organisko oglekli (*TOC* ([1])) un, vēlams, arī ar amoniju, nitrītiem un sārmainību un — jūras dzīvniekiem — sāļumu. Parametri, kas ir svarīgi optimāliem zivju eksistences apstākļiem, nav pilnībā zināmi, bet 2. papildinājumā ir sniegtas ieteicamās maksimālās koncentrācijas attiecībā uz vairākiem testos lietojamā saldūdens un jūras ūdens parametriem.

Testa laikā jābūt nemainīgai atšķaidīšanas ūdens kvalitātei. Testa sākumā pH vērtībai jābūt no 6,0 līdz 8,5, bet viena testa laikā ± 0,5 pH vienību robežās. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens nevajadzīgi neietekmē testa rezultātu (piemēram, veidojot kompleksus ar testējamo vielu) vai negatīvi neietekmē zivju krājuma rādītājus, laiku pa laikam, vismaz testa sākumā un testa beigās, jāņem paraugi analīzei. Ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+}+, Mg^{2+}+, Na+, K+, Cl- un SO_4^{2-}), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cieto vielu noteikšana jāveic, piemēram, reizi trijos mēnešos. Ja ir pierādīts, ka vismaz viena gada laikā atšķaidīšanas ūdens kvalitāte nemainās, noteikšanu var veikt retāk un intervāli var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos).

Atšķaidīšanas ūdens dabīgajam daļiņu saturam un kopējam organiskajam oglekļim jābūt iespējami zemam, lai nepieļautu, ka testējamās vielas adsorbēšanās uz organiska materiāla samazina vielas biopieejamību, kā dēļ *BCF* tiktu novērtēts par zemu. Maksimāli pieļaujamā vērtība attiecībā uz suspendētām vielām

([1]) *TOC* sastāv no daļiņu organiskā oglekļa un no izšķīdināta organiskā oglekļa, *t. i. TOC* = *POC* + *DOC*.

▼M7

(sausnu, kas neiziet caur 0,45 μm filtru) ir 5 mg/l, bet attiecībā uz kopējo organisko oglekli — 2 mg/l (sal. ar 2. papildinājumu). Ja vajag, atšķaidīšanas ūdens pirms lietošanas jāfiltrē. Organiskā oglekļa saturam, kas testa ūdenī nonācis no testa zivīm (ekskrēta) un barības pārpalikumiem, ūdenī jābūt iespējami mazam (sal. ar 46. punktu).

Testējamie šķīdumi

Sagatavo testējamās vielas izejšķīdumu ar attiecīgu koncentrāciju. Izejšķīdumu vislabāk pagatavot, testējamo vielu vienkārši iemaisot vai kratot atšķaidīšanas ūdenī. Dažos gadījumos piemērota alternatīva ir cietās fāzes desorbcijas dozēšanas sistēmas izmantošana. Šķīdinātājus un izkliedētājus (šķīdināšanas līdzekļus) izmantot parasti nav ieteicams (sal. (25)), taču šos materiālus izmantot var būt pieņemami, lai iegūtu vajadzīgās koncentrācijas izejšķīdumu, taču jāpieliek visas pūles, lai šādus materiālus izmantotu minimāli un (attiecīgā gadījumā) nepārsniegtu kritisko koncentrāciju, pie kuras veidojas micellas. Var izmantot tādus šķīdumus kā acetons, etanols, metanols, dimetilformamīds un trietilēnglikols; izmantotie izkliedētāji ir *Tween 80*, metilceluloze 0,01 % un *HCO-40*. Šķīdinātāja koncentrācijai galīgajā testa vidē visās apstrādēs jābūt vienādai (t. i., neatkarīgi no testējamās vielas koncentrācijas) un tā nedrīkst pārsniegt attiecīgās toksicitātes sliekšņvērtības, kas šķīdinātājam noteiktas testa apstākļos. Maksimālais koncentrācijas līmenis ir 100 mg/l (vai 0,1 ml/l). Maz ticams, ka šķīdinātāja koncentrācija 100 mg/l būtiski mainīs maksimālo izšķīdināto testējamās vielas koncentrāciju, ko vidē iespējams panākt (25). Būtu jāzina, cik daudz no kopējā organiskā oglekļa satura testa ūdenī ir no šķīdinātāja (kopā ar testējamo vielu). Visa testa laikā kopējā organiskā oglekļa koncentrācija testa traukā nedrīkst par vairāk nekā 10 mg/l (± 20 %) pārsniegt to organiskā oglekļa koncentrāciju, kas rodas no testējamās vielas un šķīdinātāja vai šķīdināšanas līdzekļa ([1]), ja tādu izmanto. Ar zivīm veiktos caurplūdes testos organisko vielu saturs var būtiski ietekmēt brīvi izšķīdušās testējamās vielas daudzumu, jo īpaši ļoti lipofīlām vielām. Svarīgu informāciju par attiecību starp sasaistītiem un brīvi izšķīdušiem savienojumiem, no kuriem pēdējo uzskata par biopieejamās frakcijas rādītāju, var sniegt cietās fāzes mikroekstrakcija (sal. ar 60. punktu). Testējamās vielas koncentrācijai jābūt zemākai par testējamās vielas šķīdības robežu, kāda tā testa vidē ir pat ar šķīdinātāja vai šķīdināšanas līdzekļa izmantošanu. Tūlītēji bionoārdāmi šķīdinātāji jālieto piesardzīgi, jo caurplūdes testos tie var radīt ar baktēriju augšanu saistītas problēmas. Ja, nelietojot šķīdināšanas līdzekli, izejšķīdumu sagatavot nav iespējams, jāapsver, vai nav lietderīgi izmantot nevis pētījumu par barībekspozīciju, bet gan ūdensekspozīcijas pētījumu.

Lai testēšanas kamerām piegādātu testējamās koncentrācijas, caurplūdes testiem ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti padod un atšķaida testējamās vielas izejšķīdumu (piemēram, dozējošs sūknis, proporcionāls atšķaidītājs, piesātinātāja sistēma), vai cietās fāzes desorbcijas dozēšanas sistēma. Vēlams paredzēt, ka katrā testēšanas kamerā tilpums nomainās vismaz piecas reizes dienā. Priekšroka tiek dota caurplūdes režīmam, bet, ja tas nav iespējams (piemēram, ja tas negatīvi ietekmē testa organismus), izpildot derīguma kritērijus, var izmantot pusstatisku paņēmienu (sal. ar 24. punktu). Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums jākontrolē 48 stundas pirms testa sākšanas un pēc tam testa laikā vismaz katru dienu. Šajā kontrolpārbaudē katrā testēšanas kamerā nosaka caurplūdumu un raugās, lai nevienā kamerā tas nemainītos vairāk par 20 % un arī starp kamerām neatšķirtos par lielāku vērtību.

([1]) Šādi rīkoties parasti nav ieteicams, tomēr, ja izmanto šķīdinātāju vai šķīdināšanas līdzekli, organiskā oglekļa koncentrāciju testa traukos vērtē, testējamās vielas organiskajam ogleklim pieskaitot šā līdzekļa organisko oglekli.

▼M7

Sugu izraudzīšanās

Izraugoties sugas, svarīgi kritēriji ir, lai tās būtu viegli pieejamas, lai varētu iegūt piemērota lieluma to īpatņus un tos apmierinoši turēt laboratorijā. Pie citiem kritērijiem, pēc kuriem izraugās zivju sugas, pieder to rekreatīvā, komerciālā, un ekoloģiskā nozīme, kā arī salīdzināmā jutība, agrākas izmantošanas sekmīgums utt. Testiem ieteicamās sugas ir norādītas 3. papildinājumā. Var izmantot citas sugas, bet tām var būt nepieciešams pielāgot testa procedūru, lai būtu nodrošināti piemēroti testēšanas apstākļi. Tādā gadījumā sugas izraudzīšanās pamatojums un eksperimenta metode jānorāda pārskatā. Vispār, izmantojot sugas ar mazāka izmēra zivīm, samazināsies stacionārās fāzes sasniegšanai vajadzīgais laiks, bet var būt vajadzīgs vairāk zivju (paraugu), lai varētu pietiekami analizēt lipīdsaturu un testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā. Turklāt iespējams, ka rezultātu salīdzināšanu starp dažādiem testiem un testa sugām apgrūtina jaunu un vecāku zivju atšķirības attiecībā uz skābekļa uzņemšanas rādītāju un metabolismu. Jāņem vērā, ka datu interpretēšana var sarežģīties ar zivju sugām, ko testē (agrīnā) attīstības stadijā, kad notiek strauja augšanu.

Zivju turēšana (attiecas uz ūdensekspozīciju un barībekspozīciju)

Zivju pamatpopulācija vismaz divas nedēļas jāaklimatizē testa temperatūras ūdenī (sal. ar 28. punktu) un visu laiku jānodrošina ar pietiekamu uzturu (sal. ar 45. punktu). Gan ūdenim, gan uzturam jābūt tādam pašam kā tam, ko izmantos testa laikā.

Pēc 48 stundu sākumposma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:

— ja mirstība septiņās dienās pārsniedz 10 % no populācijas, visu partiju izbrāķē;

— ja mirstība septiņās dienās ir 5–10 % no populācijas, aklimatizāciju veic septiņas papildu dienas, un, ja nākamajās septiņās dienās mirstība pārsniedz 5 %, visu partiju izbrāķē;

— ja mirstība septiņās dienās nesasniedz 5 % no populācijas, partija ir pieņemama.

Testiem izmantojamām zivīm nedrīkst būt redzamu slimību vai anormālijas pazīmju. Neizmanto nevienu slimu zivi. Zivis nevajadzētu ārstēt no slimībām divu nedēļu laikā pirms testa vai testa laikā.

TESTA VEIKŠANA

Priekštestēšana

Lai testēšanas apstākļus optimizētu galīgajam testam, piemēram, izraudzītos testējamās vielas koncentrāciju(-as), noteiktu uzņemšanas fāzes un izvadīšanas fāzes ilgumu vai noskaidrotu, vai nepieciešams veikt pilnu testu, var noderēt priekšeksperiments. Priekštestēšanas plānam jābūt tādam, lai būtu iespējams iegūt nepieciešamo informāciju. Var apsvērt, vai *BCF* atvasināšanai nepietiks ar minimizētu testu vai tomēr ir jāveic pilns pētījums (par minimizēto testu sal. ar 83.–95. punktu).

Ekspozīcijas apstākļi

Uzņemšanas fāzes ilgums

Uzņemšanas fāzes ilgumu var prognozēt, balstoties uz praktisko pieredzi (piemēram, iepriekšēju pētījumu vai strukturāli radniecīgas vielas akumulācijas pētījuma) vai noteiktām empīriskām sakarībām, kur izmantotas zināšanas vai nu par testējamās vielas šķīdību ūdenī, vai par tās oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu (ja uzņemšanas fāze atbilst pirmās pakāpes kinētikai, sal. ar 5. papildinājumu).

▼M7

Uzņemšanas fāzei jāilgst 28 dienas, ja vien nav iespējams pierādīt, ka stacionārā fāze ir sasniegta agrāk (sk. 1. papildinājumu "Definīcijas un mērvienības"). Grafiskajā attēlojumā ar testējamo vielu zivs organismā stacionārā fāze (C_f) attiecībā pret laiku ir sasniegta tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trim pēc kārtas veiktām C_f analīzēm ar paraugiem, kas ņemti ar vismaz divu dienu starplaikiem, savstarpējā sakritība ir ± 20 % robežās, un laikā starp pirmo un pēdējo secīgo analīzi nav novērojams būtisks C_f pieaugums. Analizējot apvienotus paraugus, ir vajadzīgas vismaz četras secīgas analīzes. Testējamām vielām, ko organisms uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas. Ja stacionārā fāze 28 dienu laikā nav sasniegta, *BCF* aprēķina, izmantojot vienīgi kinētisko pieeju, kas nepaļaujas uz stacionārās fāzes sasniegšanu, vai uzņemšanas fāzi var pagarināt, līdz tiek sasniegta stacionārā fāze vai līdz 60 dienām, atkarībā no tā, kas iestājas drīzāk. Vēl uzņemšanas fāzes beigās ar testējamās vielas koncentrāciju zivs organismā jāpietiek, lai varētu izdarīt ticamu aplēsi par k_2 no izvadīšanas fāzes. Ja pēc 28 dienām nav novērojama būtiska uzņemšana, testu var apturēt.

Izvadīšanas fāzes ilgums

Vielām, attiecībā uz kurām novērojama pirmās pakāpes kinētika, parasti pietiek ar pusi no uzņemšanas fāzes ilguma, lai iegūtu attiecīgu organismā esošās vielas samazinājumu (piemēram, 95 %) (sal. ar 5. papildinājumu par aplēses izskaidrojumu). Ja laiks 95 % sasniegšanai ir nerealizējami ilgs, piemēram, ja tas divreiz pārsniedz parasto uzņemšanas fāzes ilgumu (t. i., vairāk nekā 56 dienas), var izmantot īsāku laiku (piemēram, līdz brīdim, kad testējamās vielas koncentrācija ir mazāka par 10 % no stacionārās fāzes koncentrācijas). Tomēr vielām, kam ir sarežģītāki uzņemšanas un izvadīšanas modeļi nekā viena zivju nodalījuma modelī, kurā vērojama pirmās pakāpes kinētika, var būt nepieciešamas garākas izvadīšanas fāzes. Ja tiek novēroti un/vai paredzēti tādi sarežģīti modeļi, ir ieteicams lūgt padomu biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālistam, lai nodrošinātu pienācīgu testa struktūru. Ja izvadīšanas periodu paildzina, paraugojamo zivju skaits var kļūt ierobežojošs un rezultātus var ietekmēt zivju augšanas atšķirības. Šis periods būs arī atkarīgs no perioda, kura laikā testējamās vielas koncentrācija zivju organismā saglabājas virs kvantitatīvās noteikšanas analītiskās robežas.

Testa zivju skaits

Zivju skaitu uz katru testējamo koncentrāciju izraugās tādu, lai katrā paraugošanas punktā būtu pieejamas vismaz četras zivis. Zivis jāapvieno tikai tad, ja vienu zivi analizēt praktiski nav iespējams. Ja tiek plānots izveidot precīzāku līkni (un atvasinātos parametrus) vai ja prasīts pētīt metabolizēšanos (piemēram, lai, izmantojot radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas, atšķirtu metabolītus un pamatvielu), uz vienu paraugošanas punktu vajadzēs vairāk zivju. Lipīdsaturs jānosaka tam pašam bioloģiskajam materiālam, ko izmanto testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai. Ja tas nav iespējams, var būt vajadzīgas papildu zivis (sal. ar 56. un 57. punktu).

Ja izmanto pieaugušas (t. i., dzimumnobriedušas) zivis, tās pirms testa vai tā laikā nedrīkst būt nārstošanas stadijā vai nesen laidušas ikrus (t. i., jau nārstojušas). Jānorāda, vai eksperimentā izmantotas vīrišķā, sievišķā vai abu dzimumu zivis. Ja izmanto abus dzimumus, augšanas un lipīda satura atšķirībām starp dzimumiem pirms ekspozīcijas sākuma jābūt dokumentētām kā nebūtiskām, jo īpaši, ja tiek paredzēts, ka vīrišķā un sievišķā dzimuma zivis būs jāapvieno, lai nodrošinātu detektējamas vielas koncentrācijas un/vai lipīdsaturu.

▼M7

Ikvienā atsevišķā testā izraugās zivis ar līdzīgu svaru tā, lai mazākā nebūtu vieglāka par divām trešdaļām no lielākās svara. Visām jābūt vienas vecuma grupas un iegūtām no viena avota. Tā kā zivju svars un vecums var būtiski ietekmēt *BCF* vērtības (12), šī informācija precīzi jāreģistrē. Ieteicams neilgi pirms testa sākuma nosvērt zivju parauga apakšparaugu, lai noteiktu vidējo svaru (sal. ar 61. punktu).

Noslogojums

Lai līdz minimumam samazinātu testējamā savienojuma koncentrācijas samazināšanos ūdenī, ko rada zivju ievietošana testa sākumā, un arī lai nesamazinātos izšķīdušā skābekļa koncentrācija, izmanto augstu ūdens/zivju attiecību. Svarīgi, lai noslogojums būtu testā izmantotajām zivju sugām piemērots. Katrā ziņā parastais ieteicamais zivju/ūdens noslogojums ir 0,1-1,0 g zivs (slapjsvars) uz litru ūdens dienā. Augstākus zivju/ūdens noslogojumus var izmantot tad, ja ir pierādīts, ka testējamās vielas koncentrāciju var uzturēt ± 20 % robežās un ka izšķīdušā skābekļa koncentrācija nesamazinās zem 60 % piesātinājuma (sal. ar 24. punktu).

Izraugoties piemērotu noslogojuma režīmu, jāņem vērā zivju sugu ierastā dabiskā vide. Piemēram, zivīm, kuras dzīvo ūdens tilpnes dibenā, uz to pašu ūdens tilpumu var vajadzēt lielāku akvārija dibena laukumu nekā tuvu ūdens virsmai dzīvojošām zivju sugām.

Barošana

Aklimatizācijas un testa laikā zivis baro ar attiecīgu barību, kurai ir zināms lipīdu un kopējo olbaltumvielu saturs, pietiekamā daudzumā, lai tās uzturētu veselas un saglabātu ķermeņa svaru (ir pieļaujama neliela augšana). Aklimatizācijas un testa laikā zivis baro noteiktā līmenī atkarībā no izmantotās sugas, eksperimenta apstākļiem un barības enerģētiskās vērtības (piemēram, varavīksnes forelei — katru dienu aptuveni 1–2 % no ķermeņa svara). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Lai barošanas intensitāti saglabātu nemainīgu, barības daudzumu attiecīgi pārrēķina, piemēram, reizi nedēļā. Šim aprēķinam zivju svaru katrā testa kamerā var novērtēt pēc zivs, kas šajā kamerā visnesenāk paņemta paraugam. Kamerā palikušās zivis nesver.

Neapēsto barību un izkārnījumus katru dienu īsi pēc barošanas (no 30 minūtēm līdz vienai stundai) no testa kamerām jāatsūc ar sifonu. Testa laikā kameras jātur iespējami tīras, lai organiskā materiāla koncentrācija būtu iespējami zemāka (sal. ar 29. punktu), jo organiskā oglekļa klātbūtne var ierobežot testējamās vielas biopieejamību (12).

Tā kā daudzu veidu zivju barība tiek iegūti no zivju miltiem, jābūt drošībai, ka šī barība neietekmēs testa rezultātus vai neradīs nelabvēlīgu ietekmi, piemēram, ja tā satur pesticīdus (to elementus), smagos metālus un/vai pašu testējamo vielu.

Gaisma un temperatūra

Ieteicams 12–16 stundu fotoperiods, un temperatūra (± 2°C) jāpielāgo testa sugai (sal. ar 3. papildinājumu). Jābūt zināmam apgaismojuma veidam un tā īpatnībām. Jāuzmanās, lai pētījuma starojuma apstākļos nebūtu varbūtīgas testējamās vielas fotopārvērtības. Jāizmanto piemērots apgaismojums, lai zivis netiktu eksponētas nedabīgu fotoproduktu iedarbībai. Dažos gadījumos var būt lietderīgi izmantot filtru, kas ekranētu UV starojumu ar viļņa garumu zem 290 nm.

▼M7

Testējamās koncentrācijas

Sākotnēji šis tests bija paredzēts nepolārām organiskām vielām. Paredzams, ka attiecībā uz šāda veida vielu pietiks, ka zivi eksponēs vienai koncentrācijai, jo nekāda koncentrācijas ietekme nav sagaidāma, kaut arī saskaņā ar attiecīgo tiesisko regulējumu var būt nepieciešamas divas koncentrācijas. Ja testē cita veida vielas vai ir zināmi citi rādītāji par iespējamu atkarību no koncentrācijas, tests jāveic ar vēl divām vai vairākām koncentrācijām. Ja testē tikai vienu koncentrāciju, vienas koncentrācijas izmantošana jāpamato (sal. ar 79. punktu). Testējamai koncentrācijai jābūt tik zemai, cik praktiski vai tehniski iespējams (t. i., nedrīkst būt tuvu šķīdības robežai).

Dažos gadījumos (piemēram, attiecībā uz metāliem, kuru uzņemšanu zivju organismā var vismaz daļēji regulēt) ir sagaidāms, ka vielas biokoncentrēšanās ir atkarīga no tās koncentrācijas ūdenī. Tādos gadījumos jātestē vismaz divas, bet vēlams vairākas vides apstākļiem nozīmīgas koncentrācijas (sal. ar 49. punktu). Arī vielām, kuru testētajām koncentrācijām praktisku iemeslu dēļ jābūt tuvu šķīdības robežai, ieteicams testēt vismaz divas koncentrācijas, jo tas var sniegt ieskatu ekspozīcijas koncentrāciju ticamībā. Izraugoties testējamās koncentrācijas, jāiekļauj vidē sastopama koncentrācija, kā arī konkrētā novērtējuma mērķim atbilstoša koncentrācija.

Testējamās vielas koncentrācija(-s) jāizraugās zemāka(-s) par tās hroniskās ietekmes līmeni vai 1 % no tās akūtā asimptotiskā LC_{50}, videi atbilstošā diapazonā un vismaz ar tādu lieluma kārtu, kas ar izmantoto analītisko metodi pārsniedz tās kvantitatīvās noteikšanas robežu ūdenī. Augstāko pieļaujamo testējamo koncentrāciju arī iespējams noteikt, akūto 96 h LC_{50} dalot ar attiecīgo akūto/-hronisko koeficientu (piemēram, dažām vielām piemērots koeficients ir apmēram trīs, bet nedaudzi pārsniedz 100). Ja izmanto otru koncentrāciju, tai desmitkārtīgi jāatšķiras no iepriekš norādītās. Ja toksiskuma kritērija dēļ (kas ierobežo augstāko testējamo koncentrāciju) un analītiskās robežas dēļ (kas ierobežo zemāko testējamo koncentrāciju) tas nav iespējams, var izmantot koeficientu, kas ir mazāks par desmit, un jāapsver, vai neizmantot radioaktīvi iezīmētu testējamo vielu (ar visaugstāko tīrības pakāpi, piemēram, vēlams > 98 %). Jāgādā, lai neviena izmantotā koncentrācija nepārsniedz robežu, kas raksturo testējamās vielas šķīdību testa vidē.

Kontroles

Papildus testa sērijām jāizmanto viena atšķaidīšanas ūdens kontrole (sal. ar 30. un 31. punktu) vai attiecīgā gadījumā viena kontrole ar šķīdinātāju.

Ūdens kvalitātes mērījumu biežums

Testa laikā visos testa un kontroles traukos jāmēra izšķīdušais skābeklis, *TOC*, pH un temperatūra. Kontroles(-ļu) traukā un vēl vienā traukā jāmēra kopējā cietība un sāļums (attiecīgā gadījumā). Ja testē divas vai vairāk koncentrāciju, šos parametrus mēra pie augstākās (vai visaugstākās) koncentrācijas. Izšķīdušais skābeklis un sāļums (attiecīgā gadījumā) jāmēra vismaz trīs reizes — uzņemšanas perioda sākumā, apmēram vidū un uzņemšanas perioda beigās — un reizi nedēļā izvadīšanas perioda laikā. *TOC* jāmēra testa sākumā (24 un 48 stundas pirms uzņemšanas fāzes sākšanas) pirms zivju ielaišanas un vismaz reizi nedēļā uzņemšanas un izvadīšanas fāzes laikā. Temperatūra jāmēra un jāreģistrē katru dienu, pH — katra posma sākumā un beigās, un cietība — vienreiz katrā testā. Temperatūru vismaz vienā traukā vēlams pārraudzīt visu laiku.

▼M7

Zivju un ūdens paraugošana un analīze

Zivju un ūdens paraugošanas grafiks

Ūdeni no testa kamerām testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai ņem pirms zivju ielaišanas un gan uzņemšanas, gan arī izvadīšanas fāzes laikā. Ūdeni paraugo pirms barošanas, vienlaikus ar zivju paraugošanu. Biežāk paraugot var būt lietderīgi, lai būtu drošība, ka pēc zivju ievietošanas koncentrācijas ir stabilas. Uzņemšanas fāzē nosaka testējamās vielas koncentrāciju, lai pārbaudītu atbilstību derīguma kritērijiem (24. punkts). Ja izvadīšanas fāzes sākuma ūdens paraugu analīzes liecina, ka testējamā viela nav detektēta, ar to var pamatot, ka izvadīšanas fāzes atlikušajā laikā testa un kontroles ūdeni attiecībā uz testējamo vielu nemēra.

Zivis vismaz piecas reizes paraugo testējamās vielas uzņemšanas fāzes laikā un vismaz četras reizes izvadīšanas fāzes laikā. Tā kā dažos gadījumos ir grūti, pamatojoties uz šo paraugu skaitu, ar pieņemamu precizitāti izrēķināt aptuveno *BCF* vērtību, (jo īpaši, ja ir liecības, ka uzņemšanas un izvadīšanas kinētika nav vienkārša pirmās pakāpes kinētika), var būt ieteicams paraugus abās fāzēs ņemt biežāk (sal. ar 4. papildinājumu).

Vismaz uzņemšanas fāzes sākumā un beigās un izvadīšanas fāzes beigās tam pašam bioloģiskajam materiālam, ko izmanto testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai, jānosaka lipīdsaturs. Ja tas nav iespējams, jāparaugo vismaz trīs neatkarīgas zivis, lai tajos pašos trīs laikpunktos noteiktu lipīdsaturu. Eksperimenta sākumā attiecīgi jāpielāgo zivju skaits katrā tvertnē ([1]). Ja kontroles zivs organismā (*t. i.*, pamatgrupas zivī) netiek detektēts būtisks daudzums testējamās vielas, testā izmantoto kontroles zivi var analizēt vienīgi attiecībā uz lipīdsaturu un testējamās vielas analīzi testgrupā(-s) (un attiecīgo uzņemšanas ātruma konstanti, izvadīšanas ātruma konstanti un *BCF* vērtības) var koriģēt, lai būtu ņemtas vērā testa laikā notikušas pārmaiņas kontrolgrupas lipīdsaturā ([2]).

Attiecībā uz testējamo vielu vai lipīdu koncentrāciju nedrīkst analizēt mirušas vai slimas zivis.

Pieņemama paraugošanas grafika piemērs ir sniegts 4. papildinājumā. Citus grafikus iespējams viegli aprēķināt, izmantojot citas pieņemtās vērtības K_{OW}, lai aprēķinātu ekspozīcijas laiku uzņemšanai 95 % (aprēķinus sk. 5. papildinājumā).

Paraugošana uzņemšanas fāzē jāturpina tik ilgi, līdz sasniegta stacionāra fāze (sk. 1. papildinājumu "Definīcijas un mērvienības"), pretējā gadījumā uzņemšanas fāzi izbeidz (pēc 28 vai 60 dienām, sal. ar 37. un 38. punktu). Pirms izvadīšanas fāzes sākšanas zivis jāpārvieto uz tīriem traukiem.

Paraugošana un paraugu sagatavošana

Ūdens paraugus analīzei iegūst, piemēram, sifonējot caur inerta materiāla cauruli no testa kameras viduspunkta. Liekas, ka nedz ar filtrāciju, nedz ar centrifugēšanu testējamai vielai no bioloģiski pieejamās frakcijas ne vienmēr var separēt bioloģiski nepieejamo frakciju. Ņemot vērā grūtības ar bioloģisko pieejamību, ja izmanto separācijas paņēmienu, tas testēšanas pārskatā vienmēr jāpamato vai

([1]) Ja lipīdsaturu neanalizē tai pašai zivij, kurai analizēja testējamo vielu, zivij jābūt vismaz ar tādu pašu svaru un (attiecīgā gadījumā) tāda paša dzimuma.

([2]) Šī alternatīva der tikai tad, ja zivis visās testgrupās tur tāda paša lieluma grupās, izņem saskaņā ar tādu pašu sistēmu un baro tādā pašā veidā. Tas visās testgrupās nodrošina līdzīgu zivju augšanu, ja testētā koncentrācija ir zemāka par toksisko diapazonu. Ja augšana ir līdzīga, paredzams, ka līdzīgs būs arī lipīdsaturs. Atšķirīga augšana kontrolē liecinātu par vielas ietekmi un pētījumu darītu nederīgu.

▼M7

jāvalidē (25). Paraugus tā nevajadzētu apstrādāt jo īpaši attiecībā uz stipri hidrofobām vielām (*t. i.*, vielām ar log K_{OW} > 5) (12) (26), kas var adsorbēties filtra matricā vai centrifugēšanas tvertnēs. Tā vietā tvertnes jācenšas saglabāt iespējami tīras (sal. ar 46. punktu) un gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē jāmonitorē kopējā organiskā oglekļa saturs (sal. ar 53. punktu). Lai izvairītos no iespējamām samazinātas biopieejamības problēmām, slikti šķīstošām un stipri hidrofobām vielām var izmantot paraugošanu ar cietās fāzes mikroekstrakcijas paņēmieniem.

Paraugotās zivis nekavējoties eitanazē, izmantojot vispiemērotāko un humānāko metodi (veselas zivs mērīšanai nedara neko citu kā tikai zivi skalo ar ūdeni (sal. ar 28. punktu) un nosusina). Nosver un izmēra kopējo garumu ([1]). Katras atsevišķās zivs izmērīto svaru un garumu saista ar analizēto vielas koncentrāciju (un attiecīgā gadījumā lipīdsaturu), piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu.

Zivis un ūdeni visvēlamāk analizēt tūlīt pēc paraugošanas, lai, kamēr tests turpinās, nepieļautu sadalīšanos un citus zudumus un izrēķinātu aptuvenās uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes. Tūlītēja analīze arī palīdz nenokavēt, nosakot laiku, kad ir sasniegts līknes plato (stacionārā fāze).

Ja analīzi neizdara tūlīt, paraugi jāglabā saskaņā ar piemērotu metodi. Pirms pētījuma sākuma jāiegūst informācija par konkrētajai testējamai vielai atbilstošu glabāšanas metodi, piemēram, sasaldēšana, glabāšana 4°C temperatūrā, ekstrakcija utt. Glabāšanas ilgums jāizraugās tāds, lai būtu drošība, ka viela glabāšanas laikā nenoārdās.

Analītiskās metodes kvalitāte

Tā kā visu procedūru pēc būtības nosaka testējamajai vielai izmantojamās analītiskās metodes pareizība, precizitāte un jutība, eksperimentāli jāpārbauda, vai ar konkrēto metodi apmierinoša ir vielas analīzes pareizība, precizitāte un reproducējamība, kā arī testējamās vielas atgūstamība gan no ūdens, gan no zivīm. Tai jābūt daļai no priekštestēšanas. Pārbauda arī, vai testējamā viela nav detektējama atšķaidīšanas ūdenī. Ja nepieciešams, testā iegūtās testējamās vielas koncentrācijas vērtības ūdenī un zivju organismā koriģē attiecībā uz atgūstamību un kontroļu fona vērtībām. Zivju un ūdens paraugi visu laiku jāapstrādā tā, lai līdz minimumam samazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, tos, kas rodas no adsorbcijas uz paraugošanas ierīces).

Zivju paraugu analīze

Ja testā izmanto radioaktīvi iezīmētus materiālus, iespējams analītiski noteikt kopējo radioaktīvo iezīmi (*t. i.*, izejas savienojumam kopā ar metabolītiem) vai arī paraugi ir tā jātīra, lai pamatvielu varētu analizēt atsevišķi. Ja *BCF* paredzēts balstīt uz pamatvielu, vismaz uzņemšanas fāzes beigās jāraksturo galvenie metabolīti (sal. ar 6. punktu). Galvenie metabolīti ir tie, kas veido ≥ 10 % no kopējā vielu atlikuma zivju audos, tie, kas divos secīgos paraugošanas punktos veido ≥ 5 %, tie, kam visā uzņemšanas fāzes laikā vērojami pieaugoši līmeņi, un tie, par kuru toksiskumu ir zināmas bažas. Ja *BCF* veselai zivij kopējo radioaktīvi

([1]) Papildus svaram jānorāda kopējais garums, jo garuma pieauguma salīdzinājums testa laikā ir labs rādītājs tam, vai ir radusies pretēja ietekme.

▼M7

iezīmēto atlikumu ziņā ir ≥ 500, var būt ieteicams, un atsevišķām vielu kategorijām, piemēram, pesticīdiem, ir stingri ieteicams, identificēt un kvantitatīvi noteikt galvenos metabolītus. Tādu metabolītu kvantitatīvu noteikšanu var pieprasīt dažas regulatīvās iestādes. Ja noārdīšanās produkti, kas veido ≥ 10 % no kopējā radioaktīvi iezīmētā vielu atlikuma zivju audos, ir identificēti un kvantitatīvi noteikti, ir arī ieteicams identificēt un kvantitatīvi noteikt noārdīšanās produktus testa ūdenī. Ja tas nav iespējams, tas jāizskaidro testēšanas pārskatā.

Testējamās vielas koncentrācija parasti jānosaka katrai nosvērtai atsevišķai zivij. Ja tas nav iespējams, katrā paraugošanas reizē paraugus var apvienot, bet apvienošana neierobežo statistiskās procedūras, kuras var piemērot datiem, lai testā iekļautu tādu skaitu zivju, ar ko pietiktu, lai būtu iespējama vēlamā apvienošana, statistiskā procedūra un jauda. Par ievadu attiecīgajām apvienošanas procedūrām var izmantot atsauces (27) un (28).

BCF jāizsaka kā normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 % (uz slapjsvara bāzes) papildus tam, kas iegūts tieši no pētījuma (sal. ar 21. punktu), ja vien nevar argumentēt, ka lipīdi nav primārā testējamās vielas uzkrāšanās vieta. Lipīdsaturs zivī jānosaka, ja iespējams, katrā paraugošanas reizē, vēlams, tam pašam ekstraktam, kas tika sagatavots testējamās vielas analizēšanai, jo bieži vien pirms ekstrakta hromatogrāfiskas analizēšanas lipīdi no tā jāizņem. Tomēr testējamo vielu analizēšanai bieži ir vajadzīgas specifiskas ekstrakcijas procedūras, kas var būt pretrunā ar lipīdu noteikšanas testēšanas metodēm. Tādā gadījumā (līdz būs pieejamas piemērotas nedestruktīvas instrumentālās metodes) lipīdsatura noteikšanai zivīs ieteicams izmantot citādāku stratēģiju (sal. ar 56. punktu). Lipīdsatura noteikšanai jāizmanto piemērotas metodes (20). Kā standartmetodi (3) var ieteikt hloroforma/metanola ekstrakcijas paņēmienu (29), bet kā alternatīvu paņēmienu — *Smedes* metodi (31). Pēdējai minētajai metodei ir raksturīga salīdzināma ekstrakcijas efektivitāte, augsta precizitāte, ne tik toksisku organisko šķīdinātāju izmantošana un viegla izpilde. Var izmantot citas metodes, kuru precizitāte sekmīgi salīdzināma ar ieteicamām metodēm, ja tās tiek pienācīgi pamatotas. Ir svarīgi norādīt detalizētu informāciju par izmantoto metodi.

Zivs augšanas mērījums

Testa sākumā atsevišķi jānosver piecas līdz desmit pamatgrupas zivis un jāizmēra to kopējais garums. Var izmantot tās pašas zivis, kuras izmanto lipīdu analīzei (sal. ar 56. punktu). Pirms ķīmiskās analīzes vai lipīdu analīzes jānosaka katrā paraugošanas reizē gan no testgrupām, gan kontrolgrupām izmantoto zivju svars un garums. Šo paraugoto zivju mērījumus var izmantot, lai skaitliski novērtētu testtvertnēs un kontroltvertnēs palikušo zivju svaru un garumu (sal. ar 45. punktu).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Testējamās vielas uzņemšanas līkni iegūst, uzņemšanas fāzē aritmētiskā skalā pret laiku atliekot vielas koncentrāciju zivju organismā/uz zivīm (vai konkrētos audos). Ja līkne ir sasniegusi plato, tas ir, līkne ir apmēram asimptotiska laika asij, stacionāra stāvokļa *BCF* (BCF_{SS}) aprēķina šādi:

$$\frac{C_f\,stacionārais - tāvoklis(vidējais)}{C_w\,stacionārais - stāvoklis(vidējais)}$$

▼M7

C_f dinamiku var ietekmēt zivs augšana (sal. ar 72. un 73. punktu). Variācija laika gaitā ietekmē vidējo ekspozīcijas koncentrāciju (C_w). Paredzams, ka bioakumulācijas pētījumiem būtiskāka un precīzāka ir laikā svērtā vidējā koncentrācija, pat ja variācija ir attiecīgajā derīguma diapazonā (sal. ar 24. punktu). Laika svērto vidējo (*TWA*) ūdens koncentrāciju var aprēķināt saskaņā ar 5. papildinājuma 1. iedaļu.

Kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_K) jānosaka kā attiecība k_1/k_2, divu pirmo pakāpju kinētikas ātruma konstantes. Ātruma konstantes k_1 un k_2 un BCF_K iespējams iegūt, vienlaicīgi pielāgojot gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzi. Alternatīvā gadījumā k_1 un k_2 iespējams noteikt secīgi (šo metožu aprakstu un salīdzinājumu sk. 5. papildinājumā). Izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) var būt nepieciešams koriģēt attiecībā uz augšanas izraisītu atšķaidījumu (sal. ar 72. un 73. punktu). Ja uzņemšanas un izvadīšanas līkne acīmredzami nav pirmās pakāpes līkne, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru 5. papildinājumā) un jālūdz biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padoms.

Zivs svara/garuma dati

Atsevišķu zivju slapjsvaru un kopējo garumu visiem paraugošanas intervāliem norāda tabulas veidā atsevišķi testgrupām un kontrolgrupām uzņemšanas (arī pamatgrupai uzņemšanas sākumā) un izvadīšanas fāžu laikā. Katras atsevišķās zivs izmērīto svaru un garumu saista ar analizēto ķimikālijas koncentrāciju, piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu. Vēlamais augšanas mērījums, ar ko attiecībā uz augšanas izraisītu atšķaidījumu koriģēt kinētiskā *BCF* vērtību, ir svars (metodi, kas izmantota, lai koriģētu augšanas izraisīta atšķaidījuma datus, sk. 73. punktā un 5. papildinājumā).

Augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšana un lipīdu normalizācija

Zivju augšana izvadīšanas fāzē var samazināt mērāmās ķimikālijas koncentrācijas zivs organismā, kā dēļ vispārējā izvadīšanas ātruma konstante (k_2) ir augstāka, nekā tā būtu vien izvadprocesu (piemēram, elpošana, metabolisms, defekācija) rezultātā. Kinētiskie biokoncentrēšanās koeficienti jākoriģē, ierēķinot augšanas izraisīto atšķaidījumu. Augšana ietekmēs arī BCF_{SS}, bet saskaņota procedūra, kā koriģēt augšanas $BCF_{SS,}$ nav pieejama. Ja notiek vērā ņemama augšana, jāiegūst arī atbilstoši augšanai koriģēts BCF_K (BCF_{Kg}), jo attiecībā uz biokoncentrēšanās koeficientu tas var būt nozīmīgāks mērījums. Lipīdsaturs (ko bieži vien saista ar hidrofobu vielu bioakumulēšanos) testa zivju organismā praksē var pietiekami variēties un, lai varētu iegūtu jēgpilnus kinētiskos un stacionārā stāvokļa biokoncentrēšanās koeficientus, ja vien nevar argumentēt, ka testējamās vielas akumulēšanās lipīdos nav primāri nozīmīga (piemēram, dažas perfluorētas vielas var saistīties ar olbaltumvielām), jāizdara normalizācija līdz noteiktam lipīdsaturam zivs organismā (5 % masas). Šo aprēķinu vienādojumi un piemēri atrodami 5. papildinājumā.

Lai kinētisko *BCF* koriģētu, ierēķinot augšanas izraisītu atšķaidījumu, izvadīšanas ātruma konstante jākoriģē atbilstoši augšanai. Šo ar augšanu koriģēta izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) aprēķina, no vispārējās izvadīšanas ātruma konstantes (k_2) atņemot augšanas ātruma konstanti (k_g, kas iegūta no mērītā svara datiem). Pēc tam ar augšanu koriģēto kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu aprēķina, uzņemšanas ātruma konstanti (k_1) dalot ar pēc augšanas koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) (sal. ar 5. papildinājumu). Dažos gadījumos šī pieeja tiek negatīvi ietekmēta. Piemēram, attiecībā uz vielām, kuras tiek izvadītas ļoti lēni un kuras testē ātri augošās zivīs, iegūtais k_{2g} var būt ļoti neliels, līdz ar to

▼M7

kļūda abās ātruma konstantēs, ko izmanto tās iegūšanai, kļūst izšķiroši svarīga, un dažos gadījumos skaitliski novērtētais kg var pārsniegt k_2. Alternatīvā pieejā, kas apiet nepieciešamību veikt korekciju, ierēķinot augšanas izraisītu atšķaidījumu, izmanto izvadīšanas datus par testējamās vielas masu uz vienu zivi (par bāzi izmantojot veselu zivi), nevis ierastos datus par testējamās vielas masu uz zivs vienības masu (koncentrācija). To var viegli izdarīt, jo saskaņā ar šo TM testos reģistrētā koncentrācija audos jāsaista ar atsevišķu zivju masu. Vienkāršā procedūra šim uzdevumam ir aprakstīta 5. papildinājumā. Jāņem vērā, ka pat ja izmanto šo alternatīvo pieeju, pārskatā joprojām jānorāda k_2.

Pārskatā jānorāda arī kinētiskie un līdzsvara biokoncentrēšanas koeficienti attiecībā pret zivju organisma lipīdu noklusējumsaturu 5 % (masas), ja vien nav iespējams pierādīt, ka lipīdi nav primārā testējamās vielas uzkrāšanās vieta. Dati par koncentrāciju zivīs jeb *BCF* ir normalizēti saskaņā ar attiecību starp 5 % un faktisko (individuālo) vidējo lipīdsaturu (norāda slapjsvara procentos) (sal. ar 5. papildinājumu).

Ja ķimikālijas un lipīdu analīzes ir veiktas vienai un tai pašai zivij, ar lipīdiem normalizētais *BCF* jāaprēķina, izmantojot normalizētos datus par atsevišķas zivs lipīdsaturu. Alternatīvā gadījumā, ja kontroles zivīm un eksponētajām zivīm augšana bijusi vienāda, lipīdkoriģēšanai var izmantot tikai kontroles zivju lipīdsaturu (sal. ar 56. punktu). Pēc lipīdiem normalizēta *BCF* aprēķināšanas metode ir aprakstīta 5. papildinājumā.

Rezultātu interpretācija

Ja izmērītās testējamo šķīdumu koncentrācijas atrodas tuvu analītiskās metodes noteikšanas robežai, rezultāti jāinterpretē piesardzīgi.

lai izslēgtu toksisku ietekmi, vidējā augšana testgrupās un kontrolgrupās būtībā nedrīkst būtiski atšķirties. Attiecīgā procedūrā jāsalīdzina abu grupu augšanas ātruma konstantes jeb augšanas līknes ([1]).

Skaidras uzņemšanas un izvadīšanas līknes liecina par kvalitatīviem biokoncentrēšanās datiem. Attiecībā uz ātruma konstantēm jābūt vērojamai labai χ^2 piemērotības testa atbilstībai (t. i., lai ātrumu konstantes varētu uzskatīt par uzticamām (sal. ar 5. papildinājumu) attiecībā uz bioakumulācijas modeli procentuālajai mērījumu kļūdai jābūt nelielai (32)). Ja izmanto vairāk nekā vienu testa koncentrāciju, uzņemšanas/izvadīšanas konstanšu mainībai starp testa koncentrācijām jābūt mazākai nekā 20 % ([2]). Ja tā nenotiek, tas var liecināt par koncentrācijas atkarību. Jebkādas novērotas nozīmīgas uzņemšanas/izvadīšanas ātruma konstanšu atšķirības starp divām pielietotām testa koncentrācijām jānorāda un iespējami jāizskaidro pārskatā. Sekmīgi plānotu pētījumu *BCF* 95 % ticamības līmenis parasti ir tuvu ± 20 % no iegūtā *BCF*.

Ja testē divas koncentrācijas vai vairāk, abu vai visu koncentrāciju rezultātus izmanto, lai izvērtētu, vai rezultāti ir konsekventi, un lai parādītu, vai pastāv

([1]) Augšanas ātruma konstantēm var veikt *t*-testu, lai pārbaudītu, vai kontrolgrupās un testgrupās augšana atšķiras, vai dispersijas analīzes gadījumā var veikt *F*-testu. Ja nepieciešams, attiecīgu augšanas modeli var izraudzīties ar *F*-testu vai paticamības attiecības testa palīdzību (*OECD monograph* 54, (32).

([2]) Attiecībā uz šiem procentiem tiek pieņemts, ka analītiskās metodes ir ticamas un pussabrukšanas periods ilgst < 14 dienas. Ja analītiskās metodes nav tik ticamas vai pussabrukšanas periodu (stipri) palielina, šie skaitļi palielināsies.

▼M7

atkarība no koncentrācijas. Ja testē tikai vienu koncentrāciju ar mērķi samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu un/vai resursus, vienas koncentrācijas izmantošana jāpamato.

Ja BCF_K nozīmīgi pārsniedz BCF_{SS}, iegūtais BCF_{SS} ir apšaubāms, jo var liecināt, ka nav sasniegta stacionārā fāze vai nav ierēķināti augšanas izraisītais atšķaidījums un noārdīšanās procesi. Gadījumos, kad BCF_{SS} stipri pārsniedz BCF_K, iegūtās uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes jāpārbauda attiecībā uz kļūdām un jāizvērtē atkārtoti. Citādāka pielāgošanas procedūra var uzlabot BCF_K aplēses (sal. ar 5. papildinājumu).

Testēšanas pārskats

Papildus 3. punktā norādītajai informācijai par testējamo vielu testēšanas pārskatā iekļauj šādu informāciju:

Testējamā viela:

fizikālās un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskās identifikācijas dati, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā, ja tas ir praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c. (tostarp attiecīgā gadījumā organiskā oglekļa saturs);

— daudzkomponentu vielu un *UVCB* (vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli) atsevišķo komponentu ķīmiskās identitātes apraksts, ciktāl tas iespējams, un katra komponenta procentuālais īpatsvar kopējā vielas masā. Jāsniedz kopsavilkums par to, kā testā izmantotā analīzes metode atspoguļo vielas koncentrācijas mēru; jāapraksta visas analītiskās procedūras, arī metodes pareizība, metodes noteikšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robeža;

— radioaktīvi iezīmētām vielām iezīmētā(-o) atoma(-u) precīzs stāvoklis un ar piemaisījumiem saistītās radioaktivitātes īpatsvars;

— informācija par testējamās vielas toksiskumu zivīm (ideālā gadījumā — testa sugai). Toksiskums jānorāda kā akūts 96-h LC_{50} un *NOAEC* & *LOAEC* no hroniskā toksiskuma pētījuma (*t. i.*, agrīnās attīstības stadijas tests vai pilna dzīvescikla tests, ja tāds pieejams);

— testējamās ķimikālijas vai testējamās vielas glabāšanas apstākļi un testējamās ķimikālijas vai testējamās vielas stabilitāte glabāšanas apstākļos, ja tās pirms lietošanas uzglabā.

Testa sugas:

zinātniskais nosaukums, celms, avots, priekšapstrāde (ja tāda veikta), aklimatizācija, vecums, dzimums (attiecīgā gadījumā), izmēru diapazons (svars un garums) utt.

Testēšanas nosacījumi:

— izmantotā testēšanas procedūra (piemēram, caurplūdes vai pusstatiska); regulārs pētījums vai minimizēts plāns (tostarp iemesls un pamatojums);

— izmantotā apgaismojuma veids un raksturlielumi, kā arī periods(-i);

— testēšanas plāns (piemēram, testa kameru skaits un lielums, ūdens tilpuma nomaiņas ātrums, noslogojums, replikātu skaits, zivju skaits uz replikātu, testējamo koncentrāciju skaits, uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ilgums, paraugošanas biežums zivju un ūdens paraugiem);

▼M7

— izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (attiecīgā gadījumā jānorāda šķīdinātājs, tā koncentrācija un radītais organiskā oglekļa daudzums testa ūdenī) vai alternatīvas dozēšanas sistēmas apraksts;

— nominālā testējamā koncentrācija, izmērīto vērtību vidējie lielumi un to standartnovirzes testa traukos, un metode un biežums, ar kādu tie iegūti;

— atšķaidīšanas ūdens avots, priekšapstrādes apraksts (ja tāda veikta), rezultāti jebkādiem pierādījumiem par testa zivs spēju dzīvot šajā ūdenī, un ūdens īpašības: pH, cietība, temperatūra, izšķīdinātā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmenis (ja mērīts), kopējais organiskais ogleklis, suspendētās daļiņas, testa vides sāļums (attiecīgā gadījumā) un citi izdarītie mērījumi;

— ūdens kvalitāte testa traukos, pH, cietība, *TOC*, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija, izmantotās metodes un mērījumu biežums;

— detalizēta informācija par barošanu, piemēram, barības veids(-i), avots, sastāvs (ja iespējams, vismaz lipīdsaturs un olbaltumvielsaturs), izraudzītā barošanas intensitāte, izēdinātais daudzums un barošanas biežums;

— informācija par zivju un ūdens paraugu apstrādi, arī detalizēta informācija par testējamās vielas un lipīdsatura sagatavošanu, glabāšanu, ekstrakciju un ar to veiktajām analītiskajām procedūrām (un precizitāti);

— apstrādes randomizēšanai un zivju sadalīšanai pa testa traukiem izmantotās metodes;

— datums, kad testa organismi ievietoti testa šķīdumos, un testa ilgums;

— diapazona noteikšanas testa apraksts un rezultāti, ja tādi ir.

Rezultāti:

— jebkāda priekšpētījuma rezultāti;

— kontrolgrupas zivju mirstība un zivju mirstība katrā ekspozīcijas kamerā, un jebkura novērota anormāla uzvedība;

— informācija par jebkuru citu novērotu iedarbību;

— visu iesaistīto ķīmiskās analīzes procedūru pilnīgs apraksts, tostarp detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas, mainība un atlabšana;

— zivju organisma lipīdsaturs, tostarp izmantotā metode, un, ja tas iegūts, lipīdiskais normalizācijas koeficients (L_n, koeficients, ar kura palīdzību rezultātus izteikt attiecībā pret zivju lipīdsaturu 5 %);

— tabulā sakārtoti dati par zivju svaru (un garumu), kas piesaistīti ķīmiskajām koncentrācijām (un attiecīgā gadījumā ar lipīdsaturu) individuālo zivju organismā gan kontrolgrupās, gan eksponētajās grupās (piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālus identifikatorus), un aprēķini par iegūto(-ām) augšanas ātruma konstanti(-ēm);

▼M7

— tabulā sakārtoti dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā (C_f, kas piesaistīts individuālām zivīm) un ūdenī (C_w) (vidējās vērtības testgrupai un kontrolgrupai, standartnovirze un attiecīgā gadījumā diapazons) visiem paraugošanas laikiem (C_f, kas izteikts mg uz kg visa ķermeņa slapjsvara vai konkrētu tā audu, piemēram, lipīdu svara, un C_w mg/l); kontrolsērijas C_w vērtības (pārskatā jānorāda arī fona lielumi);

— līknes (tostarp visi mērītie dati), kas atspoguļo turpmāk norādīto (attiecīgā gadījumā koncentrācijas var izteikt attiecībā pret visu ķermeni un attiecībā pret lipīdsaturu, kas dzīvnieka organismam vai specifiskiem tā audiem normalizēts līdz 5 %):

  — augšana, *t. i.*, zivs svars pret laiku vai naturāllogaritmā transformētais svars pret laiku (tostarp atvasinātā augšanas ātruma konstante k_g);

  — testējamās vielas uzņemšana zivs organismā un izvadīšana no tā (vienā grafikā);

  — stacionārās fāzes panākšanai nepieciešamais laiks (ja to panāk);

  — naturāllogaritmā transformēta koncentrācija pret uzņemšanas laiku (arī atvasinātā uzņemšanas ātruma konstante k_1);

  — naturāllogaritmā transformēta koncentrācija (koncentrācija ln) pret izvadīšanas laiku (arī atvasinātā izvadīšanas ātruma konstante k_1);

  — uzņemšanas un izvadīšanas fāzes līknes, kas atspoguļo gan datus, gan pielāgoto modeli;

— ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu;

— līdzsvara biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{SS}), ja stacionārā fāze (gandrīz) sasniegta;

— kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_K) un atvasinātās uzņemšanas un izvadīšanas fāzes konstantes k_1 un k_2, un, ja izmanto secīgo pielāgošanu, kopā ar k_2 dispersijām (līknes stāvums un vienādojuma brīvais loceklis);

— ticamības robežas, standartnovirzes (ja pieejamas) un katrai testējamās vielas koncentrācijai katra izmantotā parametra aprēķināšanas/datu analīzes metodes:

  — jebkāda informācija par radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas metabolītiem un to uzkrāšanos;

  — augšanas ātruma konstante(-s) (arī 95 % ticamības intervāls(-i)) un aprēķinātā ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (k_{2g}), pussabrukšanas perioda un *BCF* (BCF_{Kg}) vērtības;

  — viss neierastais attiecībā uz testu, visas novirzes no šīm procedūrām un jebāda cita būtiska informācija;

  — tālāk sniegtā kopsavilkuma tabula ar būtiskajiem izmērītajiem un aprēķinātajiem datiem.

▼M7

Vielas uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes un biokoncentrēšanās koeficienti (*BCF*)

k_g (augšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
k_1 (vispārējā uzņemšanas ātruma konstante; l kg^{-1} diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
k_2 (vispārējā izvadīšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
k_2 (ar augšanu koriģēta izvadīšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
C_f (ķimikālijas koncentrācija zivju organismā stacionārajā fāzē; mg kg^{-1}):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
C_w (ķimikālijas koncentrācija ūdenī; mg l^{-1}):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
L_n (lipīdu normalizācijas koeficients):	Ievietot vērtību[(3)]
BCF_{SS} (līdzsvara *BCF*; l kg^{-1})	Ievietot vērtību ± SN ([2])
BCF_{SSL} (ar lipīdiem normalizēts līdzsvara *BCF*; l kg^{-1}):	Ievietot vērtību [(3)] ± SD ([2])
BCF_K (kinētiskais *BCF*; l kg^{-1})	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
BCF_K (ar augšanu koriģēts kinētiskais *BCF*; l kg^{-1})	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
$t_{1/2g}$ (ar augšanu koriģēts pussabrukšanas periods; diena):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
BCF_{KL} (ar lipīdiem normalizēts kinētiskais *BCF*; l kg^{-1}):	Ievietot vērtību
BCF_{KLG} (ar lipīdiem normalizēts un ar augšanu koriģēts kinētiskais *BCF*; l kg^{-1}):	Ievietot vērtību

([1]) TI: ticamības intervāls (ja iespējams skaitliski novērtēt)
([2]) SN: standartnovirze (ja iespējams skaitliski novērtēt)

Jāizvairās no rezultātiem, kas priekštestēšanas metodes izstrādē un eksperimenta plānā norādīti kā "nenoteikti vai kvantitatīvi noteikti uz detekcijas vai kvantitatīvās noteikšanas robežas", jo tādus ātruma konstantes aprēķiniem izmantot nav iespējams.

C.13. – II: **MINIMIZĒTS ZIVJU ŪDENSEKSPOZĪCIJAS TESTS**

IEVADS

Arvien lielākā pieredze, ko laboratorijas un regulatīvās iestādes guvušas ar pilnā testa veikšanu un interpretēšanu, liecina, ka, izņemot dažus gadījumus, uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes aplēšanā ir izmantojama pirmās pakāpes kinētika. Tādējādi uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes iespējams aplēst ar minimālu paraugošanas punktu skaitu, rezultātā atvasinot kinētisko *BCF*.

Alternatīvu *BCF* pētījumu plānu izvērtēšanas sākotnējais mērķis bija izstrādāt nelielu testu, ko izmantot starpposma testēšanā, lai atspēkotu vai apstiprinātu *BCF* aplēses, pamatojoties uz K_{OW} un *QSAR*, attiecībā uz daudzām vielām likvidētu nepieciešamību veikt pilnu pētījumu un līdz minimumam samazinātu izmaksas un dzīvnieku izmantošanu, izmantojot mazāk paraugošanu un analītisko sekvenču skaitu. Ievērojot iepriekšējās testēšanas metodes pamatstruktūru, lai

▼M7

testa rezultātus būtu iespējams integrēt ar esošajiem *BCF* datiem un testēt, kā arī interpretēt datus būtu vieglāk, mērķis bija iegūt pietiekami pareizas un precīzas *BCF* aplēses attiecībā uz riska novērtējumu lēmumu pieņemšanu. Daudzi no šajā testā izmantotajiem apsvērumiem, piemēram, derīguma kritēriji (sal. ar 24. punktu) un testa apturēšana, ja uzņemšanas fāzes beigās tiek novērota niecīga uzņemšana (sal. ar 16. un 38. punktu), ir tie paši kā pilnajā testā.

Vielām, kurām var atļaut izmantot minimizēto testa plānu, jāpieder pie vispārīgās grupas, kam šī testēšanas metode izstrādāta, t. i., nepolārām organiskajām vielām (sal. ar 49. punktu). Ja ir liecības par to, ka testējamā viela var izturēties citādi (piemēram, acīmredzama novirze no pirmās pakāpes kinētikas), normatīviem nolūkiem jāveic pilns tests.

Minimizētā testa periods parasti nav īsāks par *BCF* standarttestu, taču tajā zivju paraugošana paredzēta mazākā apjomā (pamatojumu sk. 6. papildinājumā). Tomēr strauji izvadītām vielām izvadīšanas periodu var saīsināt, lai nepieļautu, ka koncentrācijas zivju organismā jau pirms testa beigām samazinās zem noteikšanas/kvantitatīvās noteikšanas robežas. Zivju ekspozīcijas minimizētu testu ar vienu koncentrāciju var izmantot, lai noskaidrotu, vai jāveic pilns tests, un, ja iegūtie dati, no kuriem aprēķina ātruma konstantes un *BCF,* ir robusti (sal. ar 93. punktu) un rezultātā iegūtais *BCF* ir tālu no attiecīgajām normatīvajām vērtībām, pilnu testu var neveikt.

Dažos gadījumos var būt lietderīgi minimizētā testa plānu īstenot ar vairāk nekā vienu testējamo koncentrāciju kā priekštestēšanu, lai noteiktu, vai *BCF* aplēses vielai ir atkarīgas no koncentrācijas. Ja minimizētajā testā iegūtās *BCF* aplēses liecina par atkarību no koncentrācijas, būs jāveic pilns tests. Ja, pamatojoties uz tādu minimizēto testu, *BCF* aplēses nav atkarīgas no koncentrācijas, bet rezultāti netiek uzskatīti par galīgiem, jebkādu secīgu pilnu testu var izdarīt ar vienu koncentrāciju, tādējādi salīdzinājumā ar pilnu testu, ko izdara ar divām (vai vairāk) koncentrācijām, samazinot izmantoto dzīvnieku skaitu.

Vielām, uz kurām var atļaut attiecināt minimizēto testu, jābūt šādām īpašībām:

— jābūt varbūtīgi, ka tām būs aptuvena pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētika, piemēram, spriežot pēc analoģijas ar līdzīgām vielām;

— log K_{OW} < 6, ja vien nav paredzēts strauja metabolizēšanās ([1]);

— attiecībā uz analītisko paņēmienu pietiekamai šķīdībai ūdenī (sal. ar 24. punktu);

— gan zivs organismā, gan ūdenī 'jābūt viennozīmīgi kvantitatīvi nosakāmai (t. i., koncentrācijām jābūt vismaz par vienu lieluma kārtu virs kvantitatīvās noteikšanas robežas), ieteicama radioaktīva iezīmēšana (sal. ar 23. punktu); un

— izvadīšanas periodam jāpārsniedz prognozētais pussabrukšanas periods (sal. ar 5. papildinājumu par aprēķiniem) vai attiecīgi jāpielāgo izvadīšanas fāzes ilgums (sal. ar 91. punktu). Šim noteikumam ir pieļaujams izņēmums, ja paredzams, ka viela ātri metabolizēsies.

([1]) Minimizēto testu patiesībā var izmantot, lai pierādītu strauju metabolizēšanos, kad ir zināms, ka ir iespējama strauja metabolizēšanās.

▼M7

PARAUGOŠANAS GRAFIKS PĒTĪJUMIEM SASKAŅĀ AR MINIMIZĒTU PLĀNU

Zivju paraugošana

Zivju paraugošanu samazina līdz četriem paraugošanas punktiem:

— uzņemšanas fāzes vidū un beigās (pēdējais ir arī izvadīšanas fāzes sākums), piemēram, pēc 14 un 28 dienām (33);

— izvadīšanas fāzes vidū un pētījuma beigu brīdī (kad vielas koncentrācija ir < 10 % no maksimālās koncentrācijas vai vismaz noteikti beidzies viens vielas pussabrukšanas periods), piemēram, pēc 7 un 14 izvadīšanas dienām (33); ja sagaidāma vai novērojama strauja izvadīšana, izvadīšanas periods var būt jāsaīsina, lai nepieļautu, ka koncentrācijas zivs organismā pazeminās zem kvantitatīvās noteikšanas robežas;

— lipīdu mērīšana kā pilnā pētījumā;

— koriģēšana ar augšanu kā pilnā pētījumā;

— *BCF* aprēķina kā kinētisko *BCF*.

Ūdens paraugošana

Saskaņā ar minimizēto plānu ūdeni paraugo tāpat kā pilnā pētījumā (sal. ar 54. punktu) vai vismaz uzņemšanas fāzē piecas vienmērīgi sadalītas reizes un izvadīšanas fāzē ik nedēļu.

Plāna grozījumi

Ņemot vērā testējamās vielas īpašības, derīgas *QSAR* prognozes un pētījuma specifisko mērķi, var apsvērt, vai pētījuma plānā neieviest dažus grozījumus.

— Ja nepieciešama lielāka precizitāte, paraugošanas nolūkam uzņemšanas fāzes beigās izmanto vairāk zivju (6 vai 8, nevis 4).

— Ja pēc 14 dienām (vai prognozētajām izvadīšanas perioda beigām) izvadīšana nav notikusi pietiekami (t. i. > 50 %), izmanto "papildu" zivju grupu. Ja prognozētā izvadīšanas fāze ir īsāka vai garāka par 14 dienām, paraugošanas grafiku pielāgo (t. i., viena zivju grupa prognozētajās izvadīšanas fāzes beigās, otra — kad pagājusi puse no minētā laika).

— Lai izpētītu iespējamu atkarību no koncentrācijas, izmanto divas testējamās koncentrācijas. Ja ar divām koncentrācijām izdarīta minimizētā testa rezultāti liecina, ka *BCF* no koncentrācijas nav atkarīgs (*t. i.*, atšķirība ir mazāka par 20 %), var uzskatīt, ka pilnā testā (ja tādu veic) pietiek ar vienu testējamo koncentrāciju.

— Lai būtu vieglāk plānot uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ilguma plānošanu, var izmantot bioakumulācijas procesu modeļus, piemēram, *Arnot et al.* (35) ierosinātos (sk. arī 5. papildinājumu).

Aprēķini

Šīs pieejas pamatojums ir tāds, ka biokoncentrēšanās koeficientu pilnā testā var noteikt vai nu kā stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_{SS}), aprēķinot testējamās vielas koncentrācijas zivs audos attiecību pret testējamās vielas koncentrāciju ūdenī, vai kā kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K), aprēķinot uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecību pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2. Ja vien uzņemšana un izvadīšana notiek apmēram saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiskajiem procesiem, BCF_K ir derīgs pat tad, ja uzņemšanas laikā

▼M7

vielas stacionārās fāzes koncentrācija nav panākta. Lai aplēstu uzņemšanas un izvadīšanas ātruma konstantes, kā absolūts minimums ir nepieciešami divi datu punkti — viens uzņemšanas fāzes beigās (t. i., izvadīšanas fāzes sākumā) un otrs — izvadīšanas fāzes beigās (vai pēc tās būtiskas daļas). Lai pārbaudītu uzņemšanas un izvadīšanas kinētiku ([1]), ieteicams starpposma paraugošanas punkts. Aprēķinus sk. 5. un 6. papildinājumā.

Rezultātu interpretācija

Lai novērtētu testa derīgumu un tā informatīvo vērtību, jāpārliecinās, ka izvadīšanas periods pārsniedz vienu pussabrukšanas periodu. Turklāt BCF_{Km} (minimizētā testā atvasināts kinētiskais *BCF*) jāsalīdzina ar samazināto BCF_{SS} vērtību (BCF_{SS}, kas uzņemšanas fāzes beigās aprēķināts ar pieņēmumu, ka ir sasniegta stacionārā fāze. To var tikai pieņemt, jo ar paraugošanas punktu skaitu nepietiek, lai to pierādītu). Ja BCF_{Km} < samazinātais BCF_{SS}, priekšroka jādod samazinātā BCF_{SS} vērtībai. Ja BCF_{Km} ir mazāks par 70 % no samazinātā BCF_{SS}, rezultāti nav derīgi, un jāveic pilns tests.

Ja minimizētajā testā iegūtā BCF_{Km} ir tādas vērtības robežās, kas no regulatīvā viedokļa ir interesējoša, jāveic pilns tests. Ja rezultāti ir tālu no regulatīvi interesējošas vērtības (pārāk lieli vai pārāk mazi), pilnu testu var neveikt, vai var veikt pilnu testu ar vienu koncentrāciju, ja to pieprasa attiecīgais tiesiskais regulējums.

Ja tiek konstatēts, ka pēc minimizētā testa ar vienu koncentrāciju jāveic pilns tests, to var veikt ar otru koncentrāciju. Ja rezultāti ir konsekventi, pilnu testu ar vēl citu koncentrāciju var neveikt, jo tiek uzskatīts, ka vielas biokoncentrēšanās nebūs atkarīga no koncentrācijas. Ja minimizētie testi ir izdarīti ar divām koncentrācijām un rezultāti par atkarību no koncentrācijas neliecina, pilnu testu var izdarīt ar tikai vienu koncentrāciju (sal. ar 87. punktu).

Testēšanas pārskats

Minimizētā testa pārskatā jānorāda visa attiecībā uz pilnu testu prasītā informācija (sal. ar 81. punktu), izņemot datus, ko nav iespējams precizēt (t. i., līkne, kas raksturo stacionāras fāzes sasniegšanai nepieciešamo laiku, un stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients; pēdējā vietā jānorāda samazināts BCF_{ss}). Turklāt minimizētā testa izmantošana un rezultātā iegūtais BCF_{Km} jāpamato.

C.13. – III: **ZIVJU BARĪBEKSPOZĪCIJAS BIOAKUMULĀCIJAS TESTS**

IEVADS

Šajā iedaļā aprakstītā metode jāizmanto vielām, kurām nav izmantojama ūdensekspozīcijas metodoloģija (piemēram, tādēļ, ka nav iespējams uzturēt stabilas, mērāmas ūdens koncentrācijas, vai 60 ekspozīcijas dienu laikā nav iespējams panākt pietiekamu vielas uzņemšanu organismā; sk. iepriekšējās iedaļas par ūdensekspozīcijas metodi). Tomēr ir jāsaprot, ka šā testa beigupunkts būs uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (*BMF*), nevis biokoncentrēšanās koeficients (*BCF*) ([2]).

SETAC Europe konferencē 2011. gada maijā Madridē tika prezentēta jauna metode ūdenī slikti šķīstošu organisko vielu bioakumulācijas testēšanai (36). Šis darbs bija balstīts uz dažādiem literatūrā aprakstītiem bioakumulācijas pētījumiem, kuros izmantota metode ar dozēšanu un papildinātu barību (piemēram, (37)). Eiropas Savienības *PBT* darba grupai 2004. gada sākumā kopā ar pamatojošu konteksta dokumentu (39) tika iesniegts projekts protokolam (38), kas bija izstrādāts, lai mērītu tādu ūdenī slikti šķīstošu organisko vielu bioakumulācijas potenciālu, attiecībā uz kurām nav iespējams izmantot standarta ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās metodi. Vēl viens šai metodei norādītais pamatojums bija

([1]) Ja mēra tikai divus datu punktus, var veikt BCF_{Km} ticamības robežu aplēses, izmantojot paškorelācijas metodes. Ja ir pieejami arī starpposma datu punkti, BCF_{Km} ticamības robežas var aprēķināt tāpat, kā pilnā testā.

([2]) Definīcijas un mērvienības sk. 1. papildinājumā.

▼M7

tāds, ka iespējamā videsekspozīcija šādām slikti šķīstošām vielām (t. i., ar log K_{OW} > 5) galvenokārt var notikt ar barību (sal. ar (40) (41) (42) (43) (44)). Šā iemesla dēļ dažos publicētajos noteikumos par ķimikālijām ([1]) ir norādīti barībekspozīcijas testi. Tomēr jāsaprot, ka šeit aprakstītajā metodē no ūdensekspozīcijas rūpīgi izvairās, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūto *BMF* vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūtu *BMF* vērtību (kurā var kombinēties gan ūdensekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Šī pašreizējās testēšanas metodes iedaļa balstās uz minēto protokolu (38) un ir jauna metode, kas iepriekšējā TM C.13. versijā nebija norādīta. Šis alternatīvais tests dod iespēju kontrolētos laboratorijas apstākļos nepastarpināti izmeklēt barībekspozīcijas taku.

Ar to, kā izlemt, kad ūdensekspozīcijas testa vietā vēlams izmantot barībekspozīcijas testu, potenciālajiem pētniekiem jāiepazīstas šīs testēšanas metodes 1.–14. punktā. Tur atrodama informācija par dažādiem ar vielu saistītiem apsvērumiem, un tā jāņem vērā pirms testa veikšanas.

To, vai neizmantot radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas, var apsvērt, ņemot vērā līdzīgus ūdensekspozīcijas metodē minētus apsvērumus (sal. ar 6. un 65. punktu).

Uzturmetodi var izmantot, lai vienā testā testētu vairāk nekā vienu vielu, ja vien tiek izpildīti konkrēti kritēriji; tie detalizētāk izklāstīti 112. punktā. Vienkāršības labad šajā metodoloģijā aprakstīts tests, kurā izmantota tikai viena testējamā viela.

Uzturtests daudzos aspektos ir līdzīgs ūdensekspozīcijas metodei, acīmredzams izņēmums ir ekspozīcijas ceļš. Līdz ar to daudzi šeit aprakstītie metodes aspekti pārklājas ar iepriekšējā iedaļā aprakstīto ūdensekspozīcijas metodi. Cik iespējams, ir sniegtas krusteniskas norādes uz attiecīgajiem iepriekšējās iedaļas punktiem, bet skaidrības un saprotamības labad ir bijusi jāpieļauj pārklāšanās.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

Var izmantot caurplūdes vai pusstatiskus nosacījumus (sal. ar 4. punktu); caurplūdes nosacījumus ieteicams izmantot, lai ierobežotu tādu potenciālu eksponētību testējamajai vielai ūdenī, kas radusies, tai jebkādi desorbējoties no papildinātas barības vai izkārnījumiem. Testam ir divas fāzes: uzņemšana (barība ir papildināta ar testējamo vielu) un izvadīšana (tīra, neapstrādāta barība) (sal. ar 16. punktu). Uzņemšanas fāzē zivju "testa" grupu katru dienu baro ar noteiktu barību, kas ir ar testējamo vielu papildināta zināma sastāva komerciāla zivju barība. Ideālā gadījumā zivīm jāapēd visa dotā barība (sal. ar 141. punktu). Pēc tam izvadīšanas fāzes laikā zivis baro ar zivīm paredzētu tīru, neapstrādātu komerciālu barību. Līdzīgi kā ūdensekspozīcijas metodē, nepieciešamības gadījumā var izmantot vairāk nekā vienu testgrupu ar dažādām papildinātām testējamās vielas koncentrācijām, bet stipri hidrofobām organiskām testējamām vielām lielākoties pietiek ar vienu testgrupu (sal. ar 49. un 107. punktu). Ja tiek izmantot pusstatiski nosacījumi, zivis uzņemšanas fāzes beigās jāpārvieto uz jaunu vidi

([1]) Regulas (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) (OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.), vajadzībām šis jautājums ir apskatīts dokumentā "Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment", nodaļas R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; un attēls R7.10-2.

▼M7

un/vai jaunu testa kameru (gadījumam, ja uzņemšanas fāzē izmantotā vide un/vai aprīkojums noplūdes rezultātā ir kontaminēti ar testējamo vielu). Abās testa fāzēs mēra testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā. Papildus to zivju grupai, kuras baro ar papildināto barību (testgrupa), identiskos apstākļos tur zivju kontrolgrupu, ko baro identiski, vienīgi komerciālo zivju barību nepapildinot ar testējamo vielu. Šī kontrolgrupa dod iespēju kvantitatīvi noteikt testējamās vielas fona līmeņus neeksponētu zivju organismā, un to izmanto salīdzināšanai ar jebkādām testgrupā(-s) pamanītām ar apstrādi saistītām nelabvēlīgām ietekmēm ([1]). Tā arī dod iespēju salīdzināt abu grupu augšanas ātruma konstantes kā kontrolmehānismus tam, vai piedāvātā barība tiek patērēta vienādā daudzumā (skaidrojot atšķirīgas augšanas ātruma konstantes, jāņem vērā arī iespējamās barības garšas atšķirības; sal. ar 138. punktu). Gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē ir svarīgi testgrupām un kontrolgrupām dot enerģētiskās vērtības ziņā līdzvērtīgu barību.

Pamatojoties uz šīs metodes izstrādātāju pieredzi, parasti pietiek ar 7–14 dienas ilgu uzņemšanas fāzi (38) (39). Šādam diapazonam ar testa veikšanu saistītās izmaksas jāsamazina līdz minimumam, tomēr attiecībā uz lielāko daļu vielu nodrošinot pietiekamu ekspozīciju. Tomēr dažos gadījumos uzņemšanas fāzi var pagarināt (sal. ar 127. punktu). Uzņemšanas fāzes laikā vielas koncentrācija zivs organismā stacionāro fāzi var nesasniegt, tāpēc ar šo metodi iegūto datu apstrāde un rezultāti parasti balstās uz audos esošo atlieku kinētisko analīzi. (Piezīme: laiku līdz stacionārajai fāzei šajā metodē var aprēķināt ar tām pašām metodēm kā ūdensekspozīcijas testā; sk. 5. papildinājumu). Izvadīšanas fāze sākas tad, kad zivi pirmo reizi baro ar nepapildinātu barību, un parasti ilgst līdz pat 28 dienām vai līdz brīdim, kad testējamo vielu veselā zivī vairs nav iespējams kvantitatīvi noteikt, atkarībā no tā, kas ir drīzāk. Atkarībā no laika gaitā notikušajām izmaiņām mērītajās ķimikālijas koncentrācijās un no zivs izmēra izvadīšanas fāze var būt īsāka vai garāka par 28 dienām.

Šī metode dod iespēju zivju organismā noteikt testējamās vielas īpatnējo pussabrukšanas periodu ($t_{1/2}$ no izvadīšanas ātruma konstantes k_2), asimilācijas efektivitāti (absorbcija zarnās; a), kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_K), ar augšanu koriģētu kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_{Kg}) un ar lipīdiem koriģētu ([2]) kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu (BMF_{KL}) (un/vai attiecībā uz augšanu un lipīdiem koriģētu kinētisko uzturisko biomagnifikācijas koeficientu BMF_{KgL}). Ūdensekspozīcijas metodē masas pieaugums testa laikā augošas zivs organismā izraisīs testējamās vielas atšķaidīšanos un tādējādi (kinētiskais) *BMF* tiks novērtēts pārāk zemu, ja to nekoriģēs ar augšanu (sal. ar 162. un 163. punktu). Turklāt, ja tiek lēsts, ka uzņemšanas fāzē sasniegta stacionārā fāze, var aprēķināt indikatīvu stacionārās fāzes *BMF*. Ir pieejas, ar kurām iespējams no barības pētījumā iegūtajiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K) (piemēram, (44) (45) (46) (47) (48)). Tādu pieeju priekšrocības un trūkumi ir iztirzāti 8. papildinājumā.

([1]) Vairumam testējamo vielu kontroles ūdenī ideālā gadījumā nevajadzētu būt detekcijām. Fona koncentrācijām jābūt saistošām vienīgi dabiskas izcelsmes materiālos (piemēram, dažos metālos) un vielās, kuras vidē ir plaši pieejamas.

([2]) *BMF* ir definēts kā vielas koncentrācijas koeficients organismā attiecībā pret organisma barību stacionārā fāzē, tāpēc, datus par organismu un barību koriģējot ar lipīdsaturu, ierēķina lipīdus, un tādējādi to sauc par "korekciju". Šī pieeja atšķiras no ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās testā veiktās "normalizācijas", kur izmanto noteiktu lipīdsaturu organismā.

▼M7

Šis tests galvenokārt izstrādāts slikti šķīstošām nepolārām organiskajām vielām, attiecībā uz kurām zivīm vērojama aptuveni pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētika. Ja tiek testēta viela, kas neatbilst aptuveni pirmās pakāpes uzņemšanas un izvadīšanas kinētikai, jāizmanto sarežģītāki modeļi (sk. izmantoto literatūru 5. papildinājumā) un jālūdz biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padoms.

BMF parasti nosaka, analizējot testējamo vielu veselā zivī (uz slapjsvara bāzes). Ja pētījuma mērķiem tas būtiski, zivi sadalot ēdamajā un neēdamajā daļā (sal. ar 21. punktu), var paraugot konkrētus audus (piemēram, muskuļus, aknas). Turklāt kuņģa un zarnu traktu var izņemt un analizēt atsevišķi, lai noteiktu tā devumu koncentrācijās, kas visā zivs organismā konstatētas paraugošanas punktos uzņemšanas fāzes beigās un tuvu izvadīšanas fāzes sākumam, vai arī lai to izmantotu masas bilances pieejā.

Paraugotas veselās zivs lipīdsaturs jāmēra tā, lai ar lipīdiem varētu koriģēt koncentrācijas, ņemot vērā gan barības, gan zivs lipīdsaturu (sal. ar 56. un 57. punktu un 7. papildinājumu).

Lai aprēķinātu testa laikā iespējamo augšanu, jāmēra un jāreģistrē individuālu paraugotu zivju svars, to sasaistot ar attiecīgajai zivij analizēto ķimikālijas koncentrāciju (piemēram, jānorāda pārskatā, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu). Ja iespējams, jāmēra arī zivs kopējais garums ([1]). Dati par svaru ir arī vajadzīgi, lai aplēstu *BCF*, izmantojot uzturtestā iegūtos izvadīšanas datus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Jābūt pieejamai 3. un 22. punktā aprakstītajai informācijai par testējamo vielu. Ne vienmēr jānorāda analītiskā metode attiecībā uz testējamās vielas koncentrāciju ūdenī; lai mērītu koncentrācijas zivju un zivju audos, ir nepieciešamas metodes ar attiecīgu jutību.

Šo metodi var izmantot, lai vienā testā testētu vairāk nekā vienu vielu. Tomēr testējamām vielām jābūt savstarpēji saderīgām, lai, ar tām papildinot zivju barību, tās savstarpēji neiedarbotos vai lai nemainītos to ķīmiskā identitāte. Mērķis ir panākt, ka par katru kopā testēto vielu mērītie rezultāti būtiski neatšķiras no rezultātiem, kas tiktu iegūti, ja testi katrai testējamajai vielai tiktu veikti atsevišķi. Iepriekšējās analītiskās darbībās jākonstatē, ka katru vielu no vairākkārtēji papildinātas barības un no zivs audu parauga iespējams atgūt ar, pirmkārt, augstu atgūstamību (piemēram, ar > 85 % nominālu) un, otrkārt, testēšanai vajadzīgo jutību. Kopā testēto vielu kopējai devai jābūt zem kombinētās koncentrācijas, kas var izraisīt toksisku ietekmi (sal. ar 51. punktu). Turklāt eksperimenta plānā jāņem vērā ar vairāku vielu vienlaicīgu testēšanu saistīta iespējama nelabvēlīga ietekme uz zivīm un potenciāla mijiedarbīga ietekme (piemēram, metaboliska ietekme). Jāvairās vienlaicīgi testēt jonizējamas vielas. Runājot par ekspozīciju, šī metode ir arī piemērota sarežģītiem maisījumiem (sal. ar 13. punktu, kaut arī tiek izmantoti tādi paši analīzes ierobežojumi kā jebkurai citai metodei).

TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, attiecina šādus nosacījumus (sal. ar 24. punktu):

— ūdens temperatūras atšķirība apstrādgrupās vai kontrolgrupās nesasniedz ± 2°C;

([1]) Kopējais garums jāreģistrē arī testa laikā, jo tas ir labs rādītājs par to, vai ir radusies negatīva ietekme.

▼M7

— izšķīdušā skābekļa koncentrācija nav mazāka par 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

— testējamās vielas koncentrācija zivju barībā pirms uzņemšanas fāzes un tās beigās ir ± 20 % diapazonā (pamatojoties uz vismaz trīs paraugiem abos laikpunktos);

— iepriekšējās analītiskās darbībās ar papildināto uzturu ir jāpierāda, ka viela barībā ir ļoti viendabīga; vismaz trīs testa sākumā paņemti vielas koncentrācijas paraugi nedrīkst atšķirties par vairāk nekā ± 15 % no vidējā lieluma;

— nepapildinātā barībā vai ar apstrādātajiem paraugiem saistīto kontroles zivju audos testējamās vielas koncentrācijas nav detektētas vai ir konstatētas vienīgi parastā mikroelementu līmenī;

— testa beigās mirstībai un citām nelabvēlīgām ietekmēm vai slimībām gan kontrolgrupas, gan testgrupas zivīm jābūt ≤ 10 %; ja kāda iemesla dēļ testu paildzina, nelabvēlīgajai ietekmei abās grupās jābūt ≤ 5 % mēnesī un ≤ 30 % kopumā. Būtiskas atšķirības starp testgrupās un kontrolgrupās paraugoto zivju vidējo augšanas ātrumu varētu liecināt par testējamās vielas toksisko ietekmi.

STANDARTVIELAS

Ja laboratorija šādu testu iepriekš nav veikusi vai ja ir notikušas būtiskas pārmaiņas (piemēram, mainīts zivju celms vai piegādātājs, izmanto citu zivju sugu, ir būtiski mainījušies zivju izmēri, zivju barība vai papildināšanas metode utt.), ieteicams izdarīt tehniskās kompetences pētījumu, izmantojot kādu standartvielu. Standartvielu galvenokārt izmanto, lai noteiktu, vai barības papildināšanas paņēmiens pietiekami nodrošina testējamo vielu maksimālu viendabību un biopieejamību. Viens piemērs, kas izmantots nepolārām hidrofobām vielām, ir heksahlorbenzols (*HCB*), bet sakarā ar *HCB* bīstamību ([1]) jāapsver, vai neizmantot citas vielas ar esošiem ticamiem datiem par uzņemšanu un biomagnifikāciju. Ja izmanto standartvielu, testēšanas pārskatā par to jānorāda tāda pati pamatinformācija kā par testējamām vielām, arī tās nosaukums, tīrība, *CAS* numurs, struktūra, toksiskuma dati (ja pieejami) (sal. ar 3. un 22. punktu).

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

Materiāli un aprīkojums jāizmanto tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 26. punktu). Jāizmanto caurplūdes vai statiskās atjaunošanas testa sistēmas, kas testa tvertnēm nodrošina pietiekamu daudzumu atšķaidīšanas ūdens. Jāreģistrē plūsmas ātrumi.

Ūdens

Testa ūdens jāizmanto tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 27.-29. punktu). Testa vide jāraksturo saskaņā ar aprakstu, un tās kvalitātei visā testa laikā jābūt nemainīgai. Dabīgajam daļiņu saturam un kopējam organiskajam ogleklim (*TOC*) pirms testa sākuma jābūt iespējami zemam (≤ 5 mg/l suspendētās vielas; ≤ 2 mg/l kopējā organiskā oglekļa). *TOC* jāmēra vienīgi pirms testa tā ūdens raksturojuma ietvaros (sal. ar 53. punktu).

([1]) *HCB* ir iekļauta Stokholmas Konvencijas A un C pielikumā un Regulas (EK) Nr. 850/2004 par noturīgajiem organiskajiem piesārņotājiem I un III pielikumā (OV L 158, 30.4.2004., 7. lpp.).

▼M7

Uzturs

Ieteicams izmantot zivīm paredzētu komerciālu barību (peldošu un/vai lēni grimstošu granulu veidā), kam norādīts vismaz olbaltumvielu un tauku saturs. Lai efektivizētu barībekspozīciju, barības granulām pēc izmēra jābūt vienādām, t. i., zivīm jāēd vairāk pārtikas, nevis lielāki tās gabali, ignorējot mazākus. Granulu izmēram jābūt piemērotam zivju izmēram testa sākumā (piemēram, zivij ar kopējo garumu 3-7 cm var izmantot granulas, kuru aptuvenais diametrs ir 0,6–0,85 mm, bet zivīm ar kopējo garumu 6–12 cm var izmantot granulas, kuru diametrs ir 0,85–1,2 mm). Izvadīšanas fāzes sākumā granulu lielumu var koriģēt pēc zivju lieluma. Piemērota komerciāli pieejamas barības sastāva paraugs ir sniegts 7. papildinājumā. Šīs metodes izstrādē parasti izmantota testa barība ar kopējo lipīdsaturu 15–20 % (masas). Zivju barība ar tik augstu lipīdu koncentrāciju dažos reģionos var nebūt pieejama. Tādā gadījumā pētījumus var veikt ar zemāku lipīdu koncentrāciju barībā un nepieciešamības gadījumā attiecīgi pielāgot barošanas intensitāti, lai saglabātu zivju veselību (pamatojoties uz priekštestēšanu). Pirms testa sākuma un uzņemšanas fāzes beigās jāizmēra un jāreģistrē testgrupas un kontrolgrupas barības kopējais lipīdsaturs. Pētījuma pārskatā jānorāda komerciālās barības piegādātāja sniegtā detalizētā informācija par uzturvielu analīzi, mitrumu, šķiedrām un pelniem, un, ja iespējams, minerālvielām un pesticīdu atliekām (piemēram, "standarta" prioritārajiem piesārņotājiem).

Papildinot barību ar testējamo vielu, pēc iespējas jācenšas nodrošināt visas barības viendabību. Testējamās vielas koncentrācija testgrupas barībā jāizraugās, ņemot vērā analītiskā paņēmiena jutību, testējamās vielas toksiskumu (*NOEC*, ja ir zināma) un attiecīgos fizikālķīmiskos datus. Ja izmanto standartvielu, to atkarībā no analīzes jutīguma vēlams iestrādāt aptuveni 10 % apmērā no testējamās vielas koncentrācijas (vai jebkurā gadījumā — iespējami zemā koncentrācijā) (piemēram, par pieņemamu heksahlorbenzola koncentrāciju barībā tiek uzskatīti 1-100 μg/g; lai gūtu detalizētāku informāciju par *HCB* asimilācijas efektivitāti sal. ar (47)).

Zivju barību ar testējamo vielu atkarībā no tās fizikālajām īpašībām un šķīdības (sīkāku informāciju par papildināšanas metodēm sk. 7. papildinājumā) var papildināt vairākos veidos:

— ja viela šķīst un ir stabila triglicerīdos, tā pirms sajaukšanas ar zivju barību jāizšķīdina nelielā daudzumā zivju eļļas vai pārtikas augu eļļas. Šajā posmā jāraugās, lai neiegūtu barību, kurā, ņemot vērā papildinātās barības dabīgo lipīdsaturu, lipīdsaturs ir pārāk augsts, un eļļa jāpievieno minimālajā zināmajā daudzumā, kas nepieciešams, lai panāktu testējamās vielas sadalījumu un viendabību barībā; vai

— barība jāpapildina, izmantojot piemērotu organisko šķīdinātāju tā, lai nepazeminātu viendabību un biopieejamību (sakarā ar šķīdinātāja izgarošanu barībā var veidoties testējamās vielas (mikro)kristāli, un nav viegli pierādīt, ka tas nav noticis; sal. ar (49)); vai

— neviskozi šķidrumi jāpievieno tieši zivju barībai, bet tie kārtīgi jāsajauc, lai panāktu viendabīgumu un veicinātu labu asimilāciju. Maisīšanas paņēmienam jānodrošina, ka papildinātā barība ir viendabīga.

▼M7

Dažos gadījumos, piemēram, ar mazāk hidrofobām testējamām vielām, kam ir varbūtīgāk desorbēties no barības, sagatavotās barības granulas var būt jāpārklāj ar nelielu daudzumu kukurūzas/zivju eļļas (sk. 142. punktu). Tādos gadījumos kontroles barība jāapstrādā līdzīgi un galīgā sagatavotā barība jāizmanto lipīdu mērīšanā.

Ja izmanto standartvielas, to rezultātiem jābūt salīdzināmiem ar literatūrā norādītajiem datiem par pētījumiem, kas veikti tādos pašos apstākļos ar salīdzināmu barošanas intensitāti (sal. ar 45. punktu), un standartvielas specifiskajiem parametriem jāatbilst attiecīgajiem 113. punkta kritērijiem (3., 4. un 5. daļa).

Ja par testējamās vielas nesēju izmanto eļļu vai nesēja šķīdinātāju, līdzvērtīgs daudzums tā paša nesēja (atrēķinot testējamo vielu) jāsajauc ar kontroles barību, lai saglabātu līdzvērtību ar papildināto barību. Gan uzņemšanas, gan izvadīšanas fāzē ir svarīgi testgrupām un kontrolgrupām dot enerģētiskās vērtības ziņā līdzvērtīgu barību.

Papildinātā barība jāglabā apstākļos, kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā (piemēram, dzesēšana), un šie apstākļi jānorāda.

Zivju sugu izraudzīšanās

Var izmantot ūdensekspozīcijas metodē norādītās zivju sugas (sal. ar 32. punktu un 3. papildinājumu). Uzturiskos bioakumulācijas pētījumos ar organiskām vielām pirms šīs TM publicēšanas parasti izmantota varavīksnes forele (*Oncorhynchus mykiss*), karpa (*Cyprinus carpio*) un melngalvas mailīte (*Pimephales promelas*). Testa sugām attiecībā uz barošanos jāizturas noteiktā veidā, lai dotā barības deva tiktu ātri patērēta un tādējādi līdz minimumam samazināos jebkāds faktors, kas ietekmē testējamās vielas koncentrāciju barībā (piemēram, izskalošanās ūdenī un ūdensekspozīcijas varbūtība). Jāizmanto ieteiktā izmēra/svara diapazona zivis (sal. ar 3. papildinājums). Zivis nedrīkst būt tik mazas, ka tās grūti analizēt individuāli. Sugas, kas testētas straujas augšanas attīstības stadijā, var sarežģīt datu interpretāciju, un strauja augšana var ietekmēt asimilācijas efektivitātes aprēķinus ([1]).

Zivju turēšana

Pieņemšanas kritēriji attiecībā uz aklimatizāciju, mirstību un slimībām ir tādi paši kā ūdensekspozīcijas metodei pirms testa veikšanas (sal. ar 33.–35. punktu).

TESTA VEIKŠANA

Darbības pirms pētījuma veikšanas un diapazona noteikšanas **tests**

Lai pierādītu vielas atgūstamību no papildinātas barības / papildinātiem zivs audiem, ir vajadzīgs pirmspētījuma analītiskais darbs. Lai izraudzītos piemērotu barības koncentrāciju, ne vienmēr vajadzīgs diapazona noteikšanas tests. Lai parādītu, ka nelabvēlīga ietekme nav novērojama, un izvērtētu papildinātas barības garšu, analītiskās metodes jutību attiecībā uz zivjus audiem un barību,

([1]) Attiecībā uz strauju augšanu uzņemšanas fāzes laikā patiesā barošanas intensitāte samazināsies zem ekspozīcijas sākumā noteiktās.

▼M7

barošanas intensitātes piemērotību un izraudzītos paraugošanas intervālus izvadīšanas fāzes laikā utt., var veikt sākotnējus barošanas eksperimentus, bet tie nav obligāti. Sākotnējs pētījums var būt lietderīgs tam, lai aplēstu paraugošanai nepieciešamo zivju skaitu izvadīšanas fāzes laikā. Rezultātā var būtiski samazināties izmantoto zivju skaits, jo īpaši attiecībā uz testējamām vielām, kuras ir īpaši uzņēmīgas pret metabolizēšanos.

Ekspozīcijas nosacījumiem

Uzņemšanas fāzes ilgums

Uzņemšanas fāzē parasti pietiek ar 7–14 dienām, kuru laikā katru dienu vienu zivju grupu baro ar kontroles barību, bet otru — ar noteiktu testa barības devu, kas ir atkarīga no testētajām sugām un eksperimenta apstākļiem, piemēram, varavīksnes forelei tie būtu 1-2 % no ķermeņa svara (slapjsvara). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Ja vajadzīgs, uzņemšanas fāzi var paildzināt, pamatojoties uz praktisko pieredzi no iepriekšējiem pētījumiem vai zināšanām par testējamās vielas (vai analoga) uzņemšanu zivju organismā vai izvadīšanu no tā. Par testa sākumu nosaka reizi, kad notiek pirmā barošana ar papildināto barību. Eksperimenta diena ir no barošanas laika līdz brīdim īsi pirms (piem., viena stunda) nākamā barošanas laika. Tādējādi pirmā uzņemšanas eksperimenta diena sākas no pirmās barošanas reizes ar papildināto barību un beidzas neilgi pirms otrās barošanas reizes ar papildināto barību. Praksē uzņemšanas fāze beidzas neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās barošanas ar nepapildināto testējamo vielu, jo turpmākās 24 stundas zivs turpinās sagremot papildināto barību un absorbēs testējamo vielu. Ir svarīgi nodrošināt tik augstu (netoksisku) testējamās vielas uzņemšanu organismā, lai analītiskajā metodē ar to pietiktu tam, ka izvadīšanas fāzē iespējams konstatēt samazinājumu vismaz par vienu lieluma kārtu. Īpašos gadījumos, lai gūtu priekšstatu par uzņemšanas kinētiku, uzņemšanas fāzi var pagarināt (līdz 28 dienām) ar papildu paraugošanu. Uzņemšanas laikā koncentrācija zivju organismā stacionāru fāzi var nesasniegt. Tāpat kā ūdensekspozīcijas testā, arī šeit stacionārās fāzes sasniegšanai vajadzīgo laiku var aprēķināt ar vienādojumiem, tādējādi gūstot norādi par visvarbūtīgāko laiku, kas vajadzīgs, lai zivju organismā panāktu novērtējamas koncentrācijas (sal. ar 5. papildinājumu).

Dažos gadījumos var būt zināms, ka sliktas analītiskās jutības vai zemas asimilācijas efektivitātes dēļ ar 7-14 dienas ilgu vielas uzņemšanu zivs organismā nepietiks, lai ar izmantoto koncentrāciju barībā panāktu tik augstu koncentrāciju zivs organismā, ar ko pietiktu, lai izvadīšanas laikā varētu analizēt samazinājumu vismaz par vienu lieluma kārtu. Tādos gadījumos var būt lietderīgi sākotnējo barošanas fāzi pagarināt, pārsniedzot 14 dienas, vai, jo īpaši attiecībā uz ļoti metabolizējamām vielām, jāapsver, vai nepaaugstināt koncentrāciju barībā. Tomēr jāgādā, ka uzņemšanas laikā slogs organismam zivs audos saglabājas zem (skaitliski novērtētās) hroniskās nenovērojamas ietekmes koncentrācijas (*NOEC*) (sal. ar 138. punktu).

Izvadīšanas fāzes ilgums

Izvadīšana parasti ilgst līdz 28 dienām, un sākas brīdī, kad testgrupas zivis pēc uzņemšanas fāzes sāk barot ar tīru, neapstrādātu barību. Izvadīšana sākas ar pirmo "nepapildinātas" barības došanu, nevis uzreiz pēc pēdējās "papildinātās" barības došanas, jo, kā norādīts 126. punktā, turpmākās 24 stundas zivis joprojām sagremos barību un absorbēs testējamo vielu. Tādēļ pirmo paraugošanu izvadīšanas fāzē veic neilgi pirms otrās reizes, kad notiek barošana ar nepapildinātu barību. Šis izvadīšanas periods ir veidots tā, lai tiktu konstatētas vielas, kam pussabrukšanas periods potenciāli ir 14 dienas, kas atbilst bioakumulatīvu vielu ([1]) pussabrukšanas

([1]) Ūdensekspozīcijas pētījumā 14 dienu pussabrukšanas periods atbilstu *BCF* apm. 10 000 L/kg, izmantojot 1 g smagu zivi, kurai attiecīgais uzņemšanas ātrums ir apmēram 500 L/kg/d (saskaņā ar *Sijm et al* (46) vienādojumu).

▼M7

periodam, līdz ar to 28 dienās ietilpst divi tādi vielu pussabrukšanas periodi. Gadījumos, kad vielām ir ļoti liela bioakumulācija, var būt lietderīgi pagarināt izvadīšanas fāzi (ja priekštestēšana par to liecina).

Ja viela tiek izvadīta ļoti lēni, un tāpēc izvadīšanas fāzē precīzu pussabrukšanas periodu noteikt nav iespējams, novērtēšanas vajadzībām ar šo informāciju joprojām var pietikt, lai liecinātu par augstu bioakumulācijas līmeni. Un otrādi, ja viela tiek izvadīta tik ātri, ka nav iespējams iegūt ticamu nulles laika koncentrāciju (koncentrāciju uzņemšanas beigās/izvadīšanas sākumā $C_{0,d}$) un k_2 atvasināt nav iespējams, par k_2 var izdarīt piesardzīgu aplēsi (sal. ar 7. papildinājumu).

Ja agrākos intervālos (piemēram, 7 vai 14 dienās) zivīm veiktas analīzes liecina, ka viela zem kvantitatīvās noteikšanas līmeņiem izvadīta, pirms pagājis pilns 28 dienu periods, tālāku paraugošanu var pārtraukt un testu izbeigt.

Dažos gadījumos uzņemšanas perioda beigās (vai otrajā uzņemšanas paraugā) izmērāma testējamās vielas uzņemšanu var nebūt notikusi. Ja iespējams pierādīt, ka: (i) ir izpildīti 113. punktā norādītie derīguma kritēriji; un (ii) tas, ka viela nav uzņemta, nav noticis kāda cita testā vērojama trūkuma dēļ (piemēram, uzņemšanas fāze nav pietiekami ilga, barības papildināšanas paņēmiena nepilnība, kuras dēļ vielai ir slikta biopieejamība, analītiskajai metodei trūkst jutības, zivis neapēd barību utt.); pētījumu drīkst pārtraukt bez nepieciešamības to atkārtot ar garāku uzņemšanas periodu. Ja priekšdarbi liecina, ka tā varētu būt, var ieteikt izmantot "masas bilances" pieeju un analizēt fēces attiecībā uz nesagremotu testējamo vielu.

Testa zivju skaits

Līdzīgi kā ūdensekspozīcijas testā jāizraugās līdzīga svara un garuma zivis, mazākajai zivij jābūt ne vieglākai kā divām trešdaļām no lielākās zivs svara (sal. ar 40.-42. punktu).

Kopējais zivju skaits pētījumam jāizraugās, pamatojoties uz paraugošanas grafiku (vismaz viens paraugs uzņemšanas fāzes beigās un četri līdz seši paraugi izvadīšanas fāzes laikā, bet atkarībā no šo fāžu ilguma), ņemot vērā analītiskā paņēmiena jutību, koncentrāciju, kas varētu tikt panākta uzņemšanas fāzes beigās (pamatojoties uz iepriekšējām zināšanām), un izvadīšanas ilgumu (ja iepriekšējas zināšanas dod iespēju izdarīt skaitlisku novērtēšanu). Katrā reizē jāparaugo piecas līdz desmit zivis, kuru augšanas parametrus (svars un kopējais garums) mēra pirms ķīmiskās analīzes vai lipīdu analīzes.

Tā kā zivīm ir raksturīgs mainīgs izmērs, augšanas ātrums un fizioloģija, un katras zivs patērētajā barības daudzumā ir varbūtīgas atšķirības, lai pienācīgi noteiktu vidējo koncentrāciju un tās mainību, katrā intervālā jāparaugo vismaz piecas zivis no testgrupas un piecas zivis no kontrolgrupas. Ir varbūtīgāk, ka vispārējo nekontrolēto mainību testā vairāk ietekmēs izmantoto zivju mainība, nevis izmantotajām analītiskajām metodēm piemītošā mainība, un tādējādi dažos gadījumos ir attaisnoti vienā paraugošanas punktā izmantot līdz pat desmit zivīm. Tomēr, ja izvadīšanas sākumā testējamās vielas fona koncentrācijas kontroles zivju organismā nav izmērāmas, var pietikt ar divu līdz trīs kontroles zivju ķīmisko analīzi galaparaugošanas intervālā, ar nosacījumu, ka atlikušās kontroles zivis visos paraugošanas punktos joprojām paraugo attiecībā uz svaru un kopējo garumu (lai attiecībā uz augšanu no testgrupām un kontrolgrupām būtu paraugots vienāds skaits). Zivis jātur un jāsver atsevišķi (pat ja izrādās, ka vēlāk paraugošanas rezultāti būs jākombinē) un jāmēra to kopējais garums.

▼M7

Tas nozīmē, ka standarttestā ar, piemēram, 28 dienu ilgu izvadīšanu un pieciem izvadīšanas paraugiem pavisam tiks izmantotas 59–120 zivis no testgrupas un 50–110 zivis no kontrolgrupas, pieņemot, ka vielas analīzes paņēmiens dod iespēju lipīdsaturu analizēt tām pašām zivīm. Ja tām pašām zivīm, kurām veikta ķīmiskā analīze, lipīdu analīzi veikt nav iespējams un arī praktiski nav iespējams lipīdu analīzei izmantot tikai kontroles zivis (sal. ar 56. punktu), būtu nepieciešamas papildu 15 zivis (trīs no pamatgrupas testa sākumā, pa trim no kontrolgrupām un testgrupām izvadīšanas sākumā un pa trim no kontrolgrupām un testgrupām eksperimenta beigās). Paraugošanas grafika piemērs ar zivju skaitu atrodams 4. papildinājumā.

Noslogojums

Jāizmanto tikpat augsts ūdens/zivju noslogojums kā ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 43. un 44. punktu) Kaut arī šajā testā zivju/ūdens noslogojums ekspozīcijas koncentrācijas neietekmē, ieteicamais noslogojums ir 0,1–1,0 g (slapjsvars) zivju uz litru ūdens dienā, lai izšķīdinātā skābekļa koncentrācijas uzturētu pietiekamā līmenī un līdz minimumam samazinātu spriedzi testa organismiem.

Testa barība un barošana

Aklimatizācijas periodā zivis jābaro ar attiecīgu barību, kā aprakstīts iepriekš (117. punkts). Ja testu veic caurplūdes apstākļos, zivju barošanas laikā plūsma jāaptur.

Testa laikā attiecībā uz testgrupas uzturu jāievēro iepriekš aprakstītie nosacījumi (116.–121. punkts). Papildus tam, ka tiek ņemti vērā vielai specifiski faktori, analītiskā jutība, sagaidāmā koncentrācija barībā vides apstākļos un hroniskā toksiskuma līmeņi/slodze organismam, izraugoties galīgo papildinājuma koncentrāciju, vēl jāņem vērā barības garša (lai zivs nevairītos to ēst). Pārskatā jānorāda testējamās vielas nominālā papildinājuma koncentrācija. Balstoties uz pieredzi, papildinājuma koncentrācijas 1-1 000 µg/g diapazonā ir praktisks darbības diapazons attiecībā uz testējamām vielām, kam nav novērojams specifisks toksiskuma mehānisms. Vielām, kurām ir nespecifisks iedarbības mehānisms, atlieku līmeņi audos nedrīkst pārsniegt 5 µmol uz g lipīdu, jo ir varbūtīgi, ka atliekas, kas pārsniedz šo līmeni, rada hronisku ietekmi (19) (48) (50) ([1]). Attiecībā uz citām vielām jāraugās, lai nelabvēlīgu ietekmi neradītu akumulētā ekspozīcija (sal. ar 127. punktu). Tas jo īpaši novērojams tad, ja vienlaicīgi testē vairāk nekā vienu vielu (sal. ar 112. punktu).

Ar attiecīgu testējamās vielas daudzumu zivju barību var papildināt vienā no trim veidiem, kā aprakstīts 119. punktā un 7. papildinājumā. Barības papildināšanas metodes un procedūras jādokumentē pārskatā. Kontroles zivīm dod neapstrādātu barību, kura satur tikpat daudz nepapildināta eļļas nesēja, kā izmantots uzņemšanas fāzei paredzētajā papildinātajā barībā (ja tāds izmantots), vai kura apstrādāta ar "tīru" šķīdinātāju, ja testgrupas barības sagatavošanā izmantots šķīdinātāja nesējs. Apstrādātajai un neapstrādātajai barībai vismaz trīs reizes analītiski jāmēra testējamās vielas koncentrācija pirms uzņemšanas fāzes sākuma un tās beigās. Pēc apstrādātās barības eksponēšanas (uzņemšanas fāze) zivīm (abām grupām) dod neapstrādātu barību (izvadīšanas fāze).

Zivis baro ar fiksētu devu (atkarībā no sugas, piemēram, varavīksnes forelei — aptuveni 1–2 % no ķermeņa slapjsvara dienā). Barošanas intensitāti izraugās tādu, lai nenotiktu ātra augšana un liels lipīdsatura pieaugums. Jāreģistrē konkrēta barošanas intensitāte, kas noteikta eksperimenta laikam. Sākotnējā barošana jābalsta uz pamatgrupas svara mērījumiem, kas ieplānoti tieši pirms testa sākuma.

([1]) Tā kā faktiskās iekšējās koncentrācijas ir iespējams noteikt vienīgi pēc testa veikšanas, ir jāaplēš paredzamā iekšējā koncentrācija (piemēram, pamatojoties uz paredzamo *BMF* un koncentrāciju barībā; sal. vienādojums A5.8. 5. papildinājumā).

▼M7

Pamatojoties uz paraugoto zivju slapjsvaru katrā paraugošanas reizē, barības daudzumu pielāgo, lai būtu ņemta vērā augšana eksperimenta laikā. Zivju svaru un garumu testa un kontroles tvertnēs var aplēst no katrā paraugošanas reizē izmantoto zivju svara un kopējā garuma; nedrīkst svērt vai mērīt testa un kontroles tvertnēs palikušās zivis. Ir svarīgi visa eksperimenta laikā saglabāt nemainīgu barošanas intensitāti.

Barošana jānovēro, lai nodrošinātu, ka zivis redzami apēd visu doto barību, un garantētu, ka aprēķinos izmanto pareizu uzņemšanas ātrumu. Izraugoties barošanas intensitāti, kas nodrošina, ka visa reizi dienā dotā barība tiek apēsta, jāņem vērā iepriekšēji barošanas eksperimenti vai iepriekšējā pieredze. Gadījumā, ja barība konsekventi netiek apēsta, var būt ieteicams katrā eksperimenta dienā sadalīt devu pa papildu barošanas periodiem (piemēram, barošanu reizi dienā aizstāt ar divreiz mazākas devas došanu divas reizes dienā). Ja nepieciešams, otra barošana jāveic noteiktā laikā un tās laiks jānosaka tā, lai pirms zivju paraugošanas paiet maksimāli ilgs laiks (piemēram, otrās barošanas laiku nosaka eksperimenta dienas pirmajā pusē).

Kaut arī zivis parasti barību apēd ātri, ir svarīgi nodrošināt, ka viela joprojām adsorbējas uz barības. Jācenšas izvairīties, ka testējamā viela no barības disperģējas ūdenī, tādējādi zivis papildus uzturceļam eksponējot testējamās vielas koncentrācijām ūdenī. To var panākt, visu neapēsto barību (un izkārnījumus) no testa un kontroles tvertnēm izņemot vienas stundas (vēlams 30 min) laikā pēc barošanas. Turklāt var izmantot sistēmu, kurā ūdeni pastāvīgi tīra ar aktīvās ogles filtru, lai absorbētu jebkādu "izšķīdušu" kontaminantu. Caurplūdes sistēmas var palīdzēt ātri aizskalot barības daļiņas un izšķīdušās vielas ([1]). Dažos gadījumos šo problēmu var palīdzēt atrisināt mazliet mainīts papildinātās barības sagatavošanas paņēmiens (sk. 119. punktu).

Gaisma un temperatūra

Attiecībā uz ūdensekspozīcijas metodi (sal. ar 48. punktu) ieteicams 12–16 stundu fotoperiods un izmantotajai testa sugai atbilstoša temperatūra (± 2 °C) (sal. ar 3. papildinājumu). Jābūt zināmam un dokumentētam apgaismojuma veidam un īpatnībām.

Kontroles

Jāizmanto viena kontrolgrupa, kurā zivīm dod tādu pašu uzturu kā testgrupā, bet bez testējamās vielas barībā. Ja testgrupas barības papildināšanā izmantots eļļas vai šķīdinātāja nesējs, kontrolgrupas barība jāapstrādā tieši tāpat, bet bez testējamās vielas, lai testgrupas un kontrolgrupas uzturs būtu vienāds (sal. ar 121. un 139. punktu).

([1]) Sakarā ar zivju izkārnījumiem vai tādēļ, ka testējamā viela izskalojas no barības, pilnībā likvidēt testējamās vielas klātbūtni testa vidē var nebūt iespējams. Tādēļ viens risinājums ir mērīt vielas koncentrāciju ūdenī uzņemšanas perioda beigās, jo īpaši, ja tiek izmantota pusstatiska struktūra, kas palīdzēs noteikt, vai ir radusies ūdensekspozīcija.

▼M7

Ūdens kvalitātes mērījumu biežums

Spēkā ir ūdensekspozīcijas metodē aprakstītie nosacījumi, izņemot attiecībā uz *TOC*, kas jāmēra tikai pirms testa tā ūdens raksturojuma vajadzībām (sal. ar 53. punktu).

Zivju un uztura paraugošana un analīze

Uztura paraugu analīze

Testa un kontroles uztura paraugi attiecībā uz testējamo vielu un lipīdsaturu jāanalizē vismaz trīs replikātos un vismaz pirms uzņemšanas fāzes sākuma un tās beigās. Pārskatā jānorāda barības analizēšanas metodes un viendabības nodrošināšanas procedūras.

Testējamās vielas paraugi jāanalizē ar izveidoto un validēto metodi. Pirmspētījuma darbā jānosaka paredzētās parauga matricas kvantitatīvās noteikšanas robeža, procentuālo atgūstamība, traucējumi un analītiskā mainība. Ja testē radioaktīvi iezīmētu materiālu, jāņem vērā tie paši apsvērumi kā ūdensekspozīcijas metodē, ūdens analīzi aizstājot ar barības analīzi (sal. ar 65. punktu).

Zivju analīze

Katrā zivju paraugošanas reizē no ekspozīcijas un kontroles apstrādēm paraugo 5–10 indivīdus (dažos gadījumos kontroles zivju skaitu var samazināt; sal. ar 134. punktu).

Paraugošanas reizēm katrā eksperimenta dienā jānotiek vienā un tajā pašā laikā (relatīvi pret barošanas laiku), un to laiks jāplāno tā, lai līdz minimumam samazinātu iespējamību, ka barība uzņemšanas fāzes laikā un izvadīšanas fāzes agrīnā posmā paliek zarnās un stihiski palielina testējamās vielas kopējās koncentrācijas (t. i., paraugotās zivis eksperimenta dienas beigās jāaizvāc, paturot prātā, ka eksperimenta diena sākas barošanas laikā un beidzas nākamās barošanas laikā, apmēram pēc 24 stundām. Izvadīšana sākas, kad pirmo reizi tiek dota nepapildināta barība; sal. ar 128. punktu). Pirmajam izvadīšanas fāzes paraugam (kas ņemts neilgi pirms otrās barošanas ar nepapildinātu barību) ir svarīga nozīme, jo ekstrapolācija uz vienu dienu pirms šī mērījuma tiek izmantota, lai aplēstu nulles laika koncentrāciju ($C_{0,d}$, koncentrācija zivs organismā uzņemšanas beigās/izvadīšanas sākumā). Pēc vēlēšanās uzņemšanas beigās un 1. un 3. izvadīšanas dienā zivīm var izņemt kuņģa un zarna traktu un analizēt atsevišķi.

Katrā paraugošanas reizē zivis izņem no abiem testa traukiem un apstrādā tāpat, kā aprakstīts ūdensekspozīcijas metodē (sal. ar 61.–63. punktu).

Testējamās vielas koncentrācijas veselā zivī (slapjsvars) gan kontrolgrupās, gan testgrupās mēra vismaz uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes laikā. Izvadīšanas fāzes laikā ieteicami četri līdz seši paraugošanas punkti (piemēram, 1., 3., 7., 14. un 28. diena). Pēc vēlēšanās pēc 1–3 dienu ilgas uzņemšanas var noteikt papildu paraugošanas punktu, lai joprojām tuvu ekspozīcijas perioda sākumam, izmantojot uzņemšanas lineāro fāzi zivju organismā, aplēstu asimilācijas efektivitāti. Pastāv divas galvenās novirzes no grafika: (i) ja izmanto paildzinātu uzņemšanas fāzi, lai izmeklētu uzņemšanas kinētiku: tādā gadījumā

▼M7

uzņemšanas fāzē būs papildu paraugošanas punkti un līdz ar to būs jāiekļauj papildu zivis (sal. ar 126. punktu); (ii) ja pētījumu beidz uzņemšanas fāzes beigās sakarā ar to, ka nekāda izmērāma uzņemšana nav notikusi (sal. ar 131. punktu). Atsevišķās paraugotās zivis jānosver (un jāizmēra to kopējais garums), lai varētu noteikt augšanas ātruma konstantes. Vielas koncentrācijas konkrētos zivs audos (ēdamās vai neēdamās daļas) var mērīt arī uzņemšanas beigās un izraudzītajos izvadīšanas laikos. Ja testē radioaktīvi iezīmētu materiālu, jāņem vērā tie paši apsvērumi kā attiecībā uz ūdensekspozīcijas metodi, ūdens analīzi aizstājot ar barības analīzi (sal. ar 65. punktu).

Attiecībā uz periodisku standartvielas izmantošanu (sal. ar 25. punktu) testgrupas koncentrācijas vēlams mērīt uzņemšanas beigās un visās izvadīšanas reizēs, kas konkrēti noteiktas testējamai vielai (veselai zivij); kontrolgrupas koncentrācijas jāanalizē vienīgi uzņemšanas beigās (veselai zivij). Dažos gadījumos (piemēram, ja testējamās vielas un standartvielas analīzes paņēmieni nav savietojami un tāpēc, lai varētu ievērot paraugošanas grafiku, ir nepieciešamas papildu zivis) var izmantot citu pieeju, lai papildu zivju skaita nepieciešamību samazinātu līdz minimumam. Standartvielas koncentrācijas izvadīšanas laikā mēra vienīgi 1. un 3. dienā un divos nākamajos paraugošanas punktos, kas izraudzīti tā, lai standartvielai varētu noteikt ticamu nulles laika koncentrācijas ($C_{0,d}$) un k_2 aplēsi.

Ja iespējams, katrā paraugošanas reizē vai vismaz uzņemšanas fāzes sākumā un beigās un izvadīšanas fāzes beigās jānosaka lipīdsaturs atsevišķas zivs organismā (sal. ar 56. un 67. punktu). Atkarībā no analītiskās metodes (sk. 67. punktu un 4. papildinājumu) gan lipīdsatura, gan testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai var būt iespējams izmantot vienu un to pašu zivi. To vēlams darīt, lai zivju skaitu samazinātu līdz minimumam. Taču, ja tas nav iespējams, var izmantot ūdensekspozīcijas metodē aprakstīto pieeju (alternatīvos lipīdu mērīšanas variantus sk. 56. punktā). Pārskatā jādokumentē lipīdsatura kvantitatīvajā noteikšanā izmantotā metode.

Analītiskās metodes kvalitāte

Lai nodrošinātu vielai specifiskā analītiskā paņēmiena specifiskumu, pareizību, precizitāti un reproducējamību, kā arī testējamās vielas atgūstamību no barības un no zivs, jāveic eksperimentālas pārbaudes.

Zivs augšanas mērījums

Testa sākumā jānosver pamatgrupas zivju paraugs (un jāizmēra to kopējais garums). Šīs zivis jāparaugo neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās papildinātās barošanas, un eksperimenta dienu apzīmē ar "0". Zivju skaitam šajā paraugā jābūt vismaz tādam pašam kā paraugiem testa laikā. Daži no tiem var būt tā pati zivs, kas pirms uzņemšanas fāzes sākuma izmantota lipīdu analīzē (sal. ar 153. punktu). Katrā paraugošanas intervālā zivis vispirms nosver un izmēra to garumu. Katras atsevišķās zivs izmērītais svars (un garums) jāsasaista ar analizēto ķimikālijas koncentrāciju (un attiecīgā gadījumā lipīdsaturu), piemēram, katrai paraugotajai zivij izmantojot unikālu identifikācijas kodu. Šo paraugoto zivju mērījumus var izmantot, lai aplēstu testa un kontroles tvertnēs palikušo zivju svaru (un garumu).

Eksperimentāla izvērtēšana

Katru dienu jāveic un jāreģistrē novērojumi par mirstību. Jāveic un jāreģistrē papildu novērojumi par nelabvēlīgu ietekmi, piemēram, par anormālu uzvedību vai pigmentāciju. Zivis uzskata par mirušām, ja tām nav novērojamas elpošanas kustības un ja tās nereaģē uz nelielu mehānisku stimulāciju. Aizvāc visas mirušās un acīmredzami mirstošas zivis.

▼M7

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Testa rezultātus izmanto, lai kā zivs kopējā slapjsvara funkciju atvasinātu izvadīšanas ātruma konstanti (k_2). Uz zivs svara vidējo pieaugumu balstītu augšanas ātruma konstanti k_g aprēķina un izmanto, lai attiecīgā gadījumā iegūtu ar augšanu koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti k_{2g}. Turklāt jānorāda asimilācijas efektivitāte (a; absorbcija no zarnām), kinētiskais biomagnifikācijas koeficients (BMF_K) (ja nepieciešams, koriģēts ar augšanu BMF_{Kg}), ar lipīdiem koriģētā vērtība (BMF_{KL} vai BMF_{KgL}, ja koriģēts ar augšanas izraisīto atšķaidījumu) un barošanas intensitāte. Vēl, ja iespējams iegūt aplēsi par stacionārās fāzes sasniegšanai uzņemšanas fāzē nepieciešamo laiku (piemēram, 95 % no stacionārās fāzes jeb $t_{95} = 3{,}0/k_2$) un ja t_{95} vērtība liecina, ka stacionārā fāze var būt tikusi sasniegta, var iekļaut aplēsi par stacionārās fāzes *BMF* (BMF_{SS}) (sal. ar 105. un 106. punktu un 5. papildinājumu). Lai iegūtu ar lipīdiem koriģētu vērtību BMF_{SSL} (jāņem vērā, ka saskaņota procedūra stacionārās fāzes *BMF* koriģēšanai attiecībā uz augšanas izraisītu atšķaidījumu nav pieejama), šo BMF_{SS} koriģē ar lipīdiem tāpat kā iegūto kinētisko *BMF* (BMF_K). Formulas un aprēķinu piemēri sniegti 7. papildinājumā. Pastāv pieejas, ar kurām iespējams no uzturpētījumā iegūtajiem datiem aplēst kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K). Tas ir aplūkots 8. papildinājumā.

Zivs svara/garuma dati

Tabulā testgrupai un kontrolgrupai atsevišķi norāda individuālo zivju slapjsvaru un garumu par visiem periodiem, iekļaujot visas paraugošanas dienas uzņemšanas fāzes laikā (pamatgrupa uzņemšanas sākumā; kontrolgrupa un testgrupa uzņemšanas beigās un, ja to veic, agrīnā fāze (piemēram uzņemšanas 1.–3. dienā) un izvadīšanas fāze (piemēram, kontrolgrupai un testgrupai 1., 2., 4., 7., 14. un 28. diena). Augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšanai vēlamais augšanas mērs ir svars. Augšanas izraisīta atšķaidījuma datu koriģēšanai izmantoto(-ās) metodi(-es) sk. turpmāk (162. un 163. punkts) un 5. papildinājumā.

Dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā

Individuālām zivīm veiktus testējamās vielas atlieku mērījumus (vai apkopotus zivju paraugus, ja individuālas zivis izmērīt nav iespējams), kas izteikti kā slapjsvara koncentrācija (masas procentos), testa un kontroles zivīm norāda tabulas veidā ar individuālajiem paraugošanas laikiem. Ja katrai paraugotajai zivij ir veikta lipīdu analīze, attiecībā uz lipīdu koncentrāciju var iegūt un tabulā norādīt individuālās ar lipīdiem koriģētās koncentrācijas (lipīdi masas procentos).

— Atsevišķām zivīm veiktus testējamās vielas atlieku mērījumus (vai, ja zivis individuāli izmērīt nav iespējams, apkopotus zivju paraugus, sal. ar 66. punktu) attiecībā uz izvadīšanas periodu konvertē kā to naturāllogaritmus un attēlo grafiski attiecībā pret laiku (dienu). Ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu.

— Lineāro mazāko kvadrātu korelāciju aprēķina attiecībā uz ln(koncentrācija) pret izvadīšanas (diena) datiem. Līknes stāvumu un vienādojuma brīvo locekli norāda kā kopējo izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) un iegūtās nulles laika koncentrācijas ($C_{0,d}$) naturāllogaritmu (lai iegūtu detalizētāku informāciju, sal. ar 5. un 7. papildinājumu). Ja tas nav iespējams tādēļ, ka otrās izvadīšanas reizes parauga koncentrācijas samazinās zem kvantitatīvās noteikšanas robežas, var sniegt piesardzīgu k_2 aplēsi (sal. ar 7. papildinājumu).

— Līknes stāvumu un vienādojuma brīvā locekļa dispersijas aprēķina, izmantojot statistiskas standartprocedūras un ap šiem rezultātiem izvērtē un norāda 90 % (vai 95 %) ticamības intervālus.

▼M7

— Aprēķina arī tādu vidējo koncentrāciju zivs organismā, kas mērīta pēdējā uzņemšanas dienā (mērītā nulles laika koncentrācija $C_{0,m}$), un salīdzina ar atvasināto vērtību $C_{0,d}$. Ja atvasinātā vērtība ir zemāka par mērīto vērtību, šī atšķirība var liecināt, ka zarnās atrodas nesagremota papildināta barība. Ja atvasinātā vērtība ir daudz augstāka par mērīto vērtību, tas var liecināt, ka no izvadīšanas datu lineārās regresijas atvasinātās vērtības ir kļūdainas un ka jāveic atkārtots novērtējums (sk. 7. papildinājumu).

Izvadīšanas ātrums un biomagnifikācijas koeficients

Lai no datiem aprēķinātu biomagnifikācijas koeficientu, vispirms jāiegūst asimilācijas efektivitāte (testējamās vielas absorbcija zarnās α). Lai to paveiktu, jāizmanto 7. papildinājumā norādītais vienādojums A7.1., un tam jāzinā nulles laika izvadīšanas fāzē ($C_{0,d}$) iegūtā koncentrācija zivs organismā, (kopējā) izvadīšanas ātruma konstante (k_2), koncentrācija barībā (C_{food}), barības sagremošanas ātruma konstante (I) un uzņemšanas periods (t). Līknes stāvumu un vienādojuma brīvo locekli lineārajai sakarībai starp ln(koncentrācija) un izvadīšanas laiku, kā norādīts iepriekš, norāda kā kopējo izvadīšanas ātruma konstanti (k_2 = līknes stāvums) un nulles laika koncentrāciju ($C_{0,d} = e^{intercept}$). Jāpārbauda atvasināto vērtību bioloģiskā ticamība (piemēram, asimilācijas efektivitāte kā vienādojums nepārsniedz 1). *(I)* aprēķina, barības masu dalot ar ik dienu barotas zivs masu (ja baro pie 2 % no ķermeņa svara, (*I)* būs 0,02). Tomēr aprēķinā izmantoto barošanas intensitāti var būt vajadzīgs koriģēt ar zivs augšanu (to var izdarīt, izmantojot zināmo augšanas ātruma konstanti, lai katrā uzņemšanas fāzes laikpunktā aplēstu zivs svaru; sal. ar 7. papildinājumu). Gadījumos, kur k_2 un $C_{0,d}$ atvasināt nav iespējams, jo, piemēram, otrajam izvadīšanas paraugam koncentrācijas atrodas zem detekcijas robežas, var piesardzīgi aplēst k_2 un "augšējās robežas" BMF_k (sal. ar 7. papildinājumu).

Līdzko tiek iegūta asimilācijas efektivitāte (α), var aprēķināt biomagnifikācijas koeficientu, α reizinot ar uzņemšanas ātruma konstanti (I) un dalot ar (kopējo) izvadīšanas ātruma konstanti (k_2). Ar augšanu koriģēto biomagnifikācijas koeficientu aprēķina tāpat, bet izmantojot ar augšanu koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}; sal. ar 162. un 163. punktu). Ja zivs audi analizēti uzņemšanas fāzes agrīnajā lineārajā posmā, ir iespējams iegūt alternatīvu asimilācijas efektivitātes aplēsi; sal. ar 151. punktu un 7. papildinājumu. Šī vērtība atspoguļo asimilācijas efektivitātes neatkarīgu aplēsi faktiski neeksponētam organismam (*t. i.*, zivis atrodas tuvu uzņemšanas fāzes sākumam). No izvadīšanas datiem aplēsto asimilācijas efektivitāti parasti izmanto, lai atvasinātu *BMF*.

Koriģēšana ar lipīdiem un koriģēšana ar augšanas izraisītu atšķaidījumu

Zivju augšana izvadīšanas fāzes laikā var samazināt mērāmās ķimikālijas koncentrācijas zivju organismā, un tādēļ vispārējā izvadīšanas ātruma konstante k_2 pārsniedz konstanti, kas rastos tikai izvadprocesu (piemēram, metabolisma, defekācijas) rezultātā (sal. ar 72. punktu). Praksē lipīdsaturs testa zivīs (kas ir cieši saistīts ar hidrofobu vielu bioakumulāciju) un lipīdsaturs barībā var būt pietiekami atšķirīgs, lai tie būtu jākoriģē, lai biomagnifikācijas koeficienti tiktu iegūti jēgpilnā veidā. Biomagnifikācijas koeficients jākoriģē ar augšanas izraisītu atšķaidījumu (tāpat kā kinētiskais *BCF* ūdensekspozīcijas metodē) un jākoriģē ar konkrētās zivs barības lipīdsaturu (lipīdu korekcijas koeficients). Šo aprēķinu vienādojumi un piemēri atrodami attiecīgi 5. un 7. papildinājumā.

Lai koriģētu augšanas izraisītu atšķaidījumu, jāaprēķina ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (k_{2g}) (vienādojumus sk. 5. papildinājumā). Pēc tam šo ar augšanu koriģēto izvadīšanas ātruma konstanti (k_{2g}) izmanto, lai aprēķinātu ar augšanu koriģēto biomagnifikācijas koeficientu, kā norādīts 73. punktā. Dažos gadījumos šo pieeju nav iespējams izmantot. Alternatīva pieeja, kas apiet nepieciešamību koriģēt ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, ir saistīta ar to, ka izmanto

▼M7

izvadīšanas datus par testējamās vielas masu uz vienu zivi (bāze ir vesela zivs), nevis ierastos datus par testējamās vielas masu uz zivs vienības masu (koncentrācija). To var viegli panākt, jo testos saskaņā ar šo metodi reģistrētās audu koncentrācijas jāsaista ar individuālo zivju svaru. Vienkāršā procedūra ir aprakstīta 5. papildinājumā. Jāņem vērā, ka joprojām skaitliski jānovērtē un jāreģistrē k_2, pat ja tiek izmantota šī alternatīvā pieeja.

Lai izdarītu korekcijas ar lipīdsaturu barībā un zivju organismā, kur lipīdu analīze visām paraugotajām zivīm nav veikta, iegūst vidējās lipīdu frakcijas zivs organismā (masas procentos) un vidējās lipīdu frakcijas barībā ([1]). Pēc tam aprēķina lipīdu korekcijas koeficientu (L_c), zivs vidējo lipīdu frakcijas lielumu dalot ar barības lipīdu frakcijas vidējo lielumu. Lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģētas biomagnifikācijas koeficientu, biomagnifikācijas koeficientu — vai tas attiecīgā gadījumā būtu vai nebūtu koriģēts — dala ar lipīdu korekcijas koeficientu.

Ja vienai un tai pašai zivij katrā paraugošanas punktā izdarītas ķimikālijas un lipīdu analīzes, ar lipīdiem koriģētus datus par šīs zivs audiem var izmantot, lai tieši aprēķinātu ar lipīdiem koriģētu *BMF* (sal. ar (37)). Ar lipīdiem koriģētas koncentrācijas datu grafiskā attēlojumā, pamatojoties uz lipīdiem un k_2, iegūst $C_{0,d}$. Pēc tam, izmantojot tos pašus 7. papildinājumā norādītos vienādojumus, var veikt matemātisko analīzi, bet asimilācijas efektivitāti (*a*) aprēķina, izmantojot ar lipīdiem normalizētu barības uzņemšanas ātruma konstanti (I_{lipid}) un uz lipīdiem balstītu uzturkoncentrāciju ($C_{\text{food-lipid}}$). Pēc tam ar lipīdiem koriģētus parametrus līdzīgā veidā izmanto *BMF* aprēķināšanai (jāņem vērā, ka, lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģēto un ar augšanu koriģēto BMF_{KgL}, arī augšanas ātruma konstantes korekcija jāattiecina uz lipīdu frakciju, nevis uz zivs slapjsvaru).

Rezultātu interpretācija

Lai izslēgtu toksisku ietekmi, vidējā augšana testgrupās un kontrolgrupās būtībā nedrīkst būtiski atšķirties. Attiecīgā procedūrā jāsalīdzina abu grupu augšanas ātruma konstantes jeb augšanas līknes ([2]).

Testēšanas pārskats

Pēc pētījuma beigām sagatavo galapārskatu, kurā iekļauj informāciju par *testējamo vielu*, *testa sugām* un *testa nosacījumiem*, kā norādīts 81. punktā (tāpat kā attiecībā uz ūdensekspozīcijas metodi). Turklāt jānorāda šāda informācija:

Testējamā viela:

— jebkāda informācija par testējamās vielas stabilitāti sagatavotajā barībā.

([1]) Šī pieeja ir specifiska ar barību saistītā pētījumā un atšķiras no ūdensekspozīcijas metodē ievērotās procedūras, tādēļ, lai neradītu neskaidrību, tiek izmantots vārds "korekcija", nevis "normalizācija" — sk. arī zemsvītras piezīmi 106. punktā.

([2]) Augšanas ātruma konstantēm var veikt *t*-testu, lai pārbaudītu, vai kontrolgrupās un testgrupās augšana atšķiras un vai dispersijas analīzes gadījumā var veikt *F*-testu. Ja nepieciešams, *F*-testu vai iespējamības attiecības testu var izmantot, lai vieglāk izraudzītos attiecīgu augšanas modeli (*OECD monograph* 54, (32).

▼M7

Testēšanas nosacījumi:

— vielas nominālā koncentrācija barībā, papildināšanas paņēmiens, barības papildināšanā izmantotā (lipīdu) nesēja daudzums (ja izmanto), testējamās vielas koncentrācijas mērījumi papildinātajā barībā katrai analīzei (vismaz trīs reizes pirms pētījuma sākšanas un uzņemšanas beigās) un vidējās vērtības;

— ja tādus izmanto, barības papildināšanai izmantotā nesēja eļļas vai šķīdinātāja (tīrība, piegādātājs utt.) veids un kvalitāte;

— izmantotais barības veids (proksimāta analīze [1]), tīrība vai kvalitāte, piegādātājs utt.), barošanas intensitāte uzņemšanas fāzes laikā, dotās barības daudzums un biežums (tostarp korekcijas uz paraugoto zivju svara bāzes);

— laiks, kad zivis katrā paraugošanas punktā (piemēram, vienu stundu pirms nākamās barošanas reizes dienā) savāktas un eitanizētas ķīmiskās analīzes nolūkam.

Rezultāti:

— jebkādu iepriekš veiktu pētniecisko darbību rezultāti;

— informācija par jebkādu novērotu negatīvu ietekmi;

— pilnīgs apraksts par visām izmantotajām ķīmiskās analīzes procedūrām, tostarp detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas, mainība un atgūstamība;

— izmērītās lipīdu koncentrācijas barībā (papildinātajā un kontroles barībā), individuālās vērtības, vidējās vērtības un standartnovirzes;

— tabulā norādīti dati par zivs svaru (un garumu), kas saistīti ar atsevišķu zivi, gan kontroles, gan eksponētajās grupās (piemēram, katrai zivij izmantojot unikālus identifikatorus), un aprēķini par iegūto(-ām) augšanas ātruma konstanti(-ēm) un 95 % ticamības intervālu(-iem);

— tabulā norādīti dati par testējamās vielas koncentrāciju zivju organismā, izmērītā vidējā koncentrācija uzņemšanas beigās ($C_{0,m}$) un iegūtā (kopējā) izvadīšanas ātruma konstante (k_2), un koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā ($C_{0,d}$) kopā ar šo vērtību dispersijām (līknes stāvums un vienādojuma brīvais loceklis);

— tabulā norādīti dati par zivju lipīdsaturu (attiecīgā gadījumā attiecībā pret specifisku vielas koncentrāciju), testgrupu un kontrolgrupu vidējās vērtības testa sākumā, uzņemšanas beigās un izvadīšanas beigās;

— līknes (tostarp visi mērītie dati), kas atspoguļo turpmāk norādīto (attiecīgā gadījumā koncentrācijas var izteikt visam dzīvnieka ķermenim vai konkrētiem tā audiem):

  — augšana (t. i., zivs svars (un garums) pret laiku) vai naturāllogaritmā transformēts svars pret laiku;

[1] Pārtikas produktu analīzes paņēmiens olbaltumvielu, lipīdu, jēlšķiedras un pelnu satura noteikšanai; šī informācija parasti ir pieejama no barības piegādātāja.

▼M7

— testējamās vielas izvadīšana no zivs organisma; un

— naturāllogaritmā transformētā koncentrāciju (ln koncentrācija) pret izvadīšanas laiku (arī iegūtā izvadīšanas ātruma konstante k_2 un no naturāllogaritma iegūtā koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā $C_{0,d}$);

— ja grafiskā attēlojuma vizuālajā pārbaudē ir acīmredzamas izlecošās vērtības, maldīgus datu punktus likvidēt, kā arī to trūkumu dokumentēti pamatot var ar statistiski derīgu izlecošo vērtību testu;

— aprēķinātā ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante un ar augšanu koriģētais pussabrukšanas periods;

— aprēķinātā asimilācijas efektivitāte (α);

— "neapstrādāts" uztura *BMF*, ar lipīdiem koriģēts un ar augšanas izraisītu atšķaidījumu koriģēts kinētiskais *BMF* ("neapstrādāts" un ar lipīdiem koriģēts, uz veselas zivs slapjsvara bāzes), attiecīgā gadījumā audiem specifisks *BMF*;

— jebkāda informācija par radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas metabolītiem un to uzkrāšanos;

— viss neierastais attiecībā uz testu, visas novirzes no šīm procedūrām un jebkāda cita būtiska informācija;

— tālāk sniegtā kopsavilkuma tabula ar būtiskajiem izmērītajiem un aprēķinātajiem datiem.

Vielas izvadīšanas ātruma konstantes un biomagnifikācijas koeficienti (BMF_K)	
k_g (augšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
k_2 (kopējā izvadīšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI)
k_2 (ar augšanu koriģēta izvadīšanas ātruma konstante; diena^{-1}):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
$C_{0,m}$ (izmērītā nulles laika koncentrācija, koncentrācija zivs organismā uzņemšanas fāzes beigās (µg/g):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
$C_{0,d}$ (iegūtā izvadīšanas fāzes nulles laika koncentrācija; µg/g):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
I (noteiktais barības uzņemšanas ātrums; g barības uz g zivju dienā):	Ievietot vērtību
I_g (spēkā esošā barošanas intensitāte, kas koriģēta ar augšanu; g barības uz g zivju dienā) ([2]):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
C_{food} (ķimikālijas koncentrācija barībā; µg/g):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
α (vielas asimilācijas efektivitāte):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
BMF_K (kinētiskais barības *BMF*):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])
BMF_{Kg} (ar augšanu koriģēts kinētiskais barības *BMF*):	Ievietot vērtību (95 % TI) ([1])

▼M7

Vielas izvadīšanas ātruma konstantes un biomagnifikācijas koeficienti (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (ar augšanu koriģēts pussabrukšanas periods dienās):	Ievietot vērtību ± SN ([2])
Lc (lipīdu korekcijas koeficients):	Ievietot vērtību
BMF_{KgL} (ar lipīdiem un ar augšanu koriģēts kinētiskais *BMF*):	Ievietot vērtību
$BMF_{SS\text{-}L}$ (indikatīvs ar lipīdiem koriģēts stacionārās fāzes *BMF*) ([2]):	Ievietot vērtību ± SN ([2])

([1]) TI: ticamības intervāls (ja iespējams novērtēt).
([2]) SN: standartnovirze (ja iespējams novērtēt).

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test.*

(2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*

(3) Li A, 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) Chapter A.8 of this Annex, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.

(5) Chapter A.24 of this Annex, Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.

(6) Chapter A.23 of this Annex, Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.

(7) Chapter C.7 of this Annex, Hydrolysis as a Function of pH.

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Chapter A.5 of this Annex, Surface Tension of Aqueous Solutions.

(10) Chapter A.4 of this Annex, Vapour Pressure.

(11) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability.

(12) Chapter C.29 of this Annex, Ready Biodegradability – CO_2 in sealed vessels

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and 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. February 2011. Available from: 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Chapter C.47 of this Annex, Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.

(23) Chapter C.15 of this Annex, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

(24) Chapter C.14 of this Annex, Fish, Juvenile Growth Test.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and 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), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/-MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and 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. and 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. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and 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) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and 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. and 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. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and 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. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and 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. and 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. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: 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. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Asimilācijas efektivitāte (α) ir tā relatīvā vielas apjoma mērs, kas no zarnām uzsūcas organismā (α nav mērvienību, bet to bieži izsaka procentos, nevis kā daļu).

Bioakumulācija parasti apzīmē procesu, kurā vielas koncentrācija organismā sasniedz tādu līmeni, kas pārsniedz līmeni elpošanas vidē (piemēram, ūdens zivij vai gaiss zīdītājam), barībā vai abos (1).

Biokoncentrēšanās ir testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā virsmas (vai konkrētos tā audos) attiecībā pret testējamās vielas koncentrāciju apkārtējā vidē.

Biokoncentrēšanās koeficients (*BCF* jeb K_B) jebkurā laikā šā akumulācijas testa uzņemšanas fāzē ir testējamās vielas koncentrācija zivs organismā, uz tā virsmas, vai noteiktos tās audos (C_f kā mg/kg), dalīta ar vielas koncentrāciju apkārtējā vidē (C_w kā mg/l). *BCF* izsaka $l \cdot kg^{-1}$. Jāņem vērā, ka korekcijas attiecībā uz augšanu un/vai standarta lipīdsaturu nav ierēķinātas.

Biomagnifikācija ir testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā virsmas (vai konkrētos tā audos) attiecībā pret testējamās vielas koncentrāciju barībā.

Biomagnifikācijas koeficients (*BMF*) ir vielas koncentrācija plēsīga dzīvnieka organismā attiecībā pret tās koncentrāciju plēsīga dzīvnieka laupījumā (vai barībā) stacionārā fāzē. Šajā testēšanas metodē aprakstītā metode no ūdensekspozīcijas fāzes rūpīgi izvairās, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūtu *BMF* vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūtu *BMF* vērtību (kurā var būt apvienota gan ūdensekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Uzturiskais biomagnifikācijas koeficients (uzturiskais *BMF*) ir termins, ko šajā testēšanas metodē izmanto, lai apzīmētu rezultātu, kas gūts uzturekspozīcijas testā, kurā notiek piesardzīga izvairīšanās no ūdensekspozīcijas fāzes, tāpēc ar šo testēšanas metodi iegūtu uzturiskā *BMF* vērtību nav iespējams tieši salīdzināt ar lauka pētījumā iegūtu *BMF* vērtību (kurā var būt apvienota gan ūdensekspozīcija, gan barībekspozīcija).

Izvadīšanas jeb pēcekspozīcijas (zuduma) fāze ir laiks pēc testa zivju pārvietošanas no vides, kas satur testējamo vielu, vidē, kas šo vielu nesatur; šajā laikā tiek pētīta vielas izvadīšana (jeb neto zudums) no testa zivīm (vai konkrētiem to audiem).

Izvadīšanas (zuduma) ātruma konstante (k_2) ir skaitliska vērtība, kas raksturo testējamās vielas koncentrācijas samazināšanos testa zivīs (vai konkrētos to audos) pēc testa zivju pārvietošanas no testējamo vielu saturošas vides uz šo vielu nesaturošu vidi (k_2 izsaka $dienā^{-1}$).

Izšķīdušais organiskais ogleklis (*DOC*) ir oglekļa koncentrācijas mērs, kura izcelsme ir testa vidē izšķīduši bioloģiskie avoti.

Ekspozīcijas jeb uzņemšanas fāze ir laiks, kurā zivis ir eksponētas testējamajai vielai.

Barības uzņemšanas ātrums (*I*) ir vidējais barības daudzums, ko katra zivs apēd katru dienu, attiecībā pret aplēsto zivs vidējo ķermeņa masu (kas izteikta kā g barības uz g zivs masas dienā).

▼M7

Kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_K) ir uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecība pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2 (t. i., k_1/k_2 – attiecīgās definīcijas sk. šajā papildinājumā). Šai vērtībai būtībā jābūt salīdzināmai ar BCF_{SS} (definīciju sk. iepriekš), taču var rasties novirzes, ja stacionārā fāze nav noteikta vai ja kinētiskais *BCF* ir koriģēts ar augšanu.

Ar lipīdiem normalizēts kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{KL}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 %.

Ar lipīdiem normalizēts un ar augšanu koriģēts kinētiskais biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{KgL}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 % un koriģēts ar augšanu pētījuma perioda laikā, kā aprakstīts 5. papildinājumā.

Ar lipīdiem normalizēts stacionārās fāzes biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{SSL}) ir normalizēts zivij ar lipīdsaturu 5 %.

REACH regulas nolūkam daudzkomponentu viela ir definēta kā viela, kam ir vairāk nekā viena galvenā sastāvdaļa ar koncentrāciju no 10 % līdz 80 % (masas).

Oktanola-ūdens sadalījuma koeficients (K_{OW}) ir attiecība, kas raksturo vielas šķīdību *n*-oktanolā pret tās šķīdību ūdenī stacionārā fāzē (metodes A.8. (2), A.24. (3), A.23. (4)), izteic arī ar P_{OW}. K_{OW} logaritmu izmanto kā rādītāju, kas raksturo potenciālo vielas biokoncentrāciju ūdens organismos.

Organiskā oglekļa daļiņas (*POC*) ir koncentrācijas mērs ogleklim, kas testa vidē radies no suspendētiem organiskiem avotiem.

Cietās fāzes mikroekstrakcija (*SPME*) ir atšķaidīšanas sistēmām izstrādāts analītiskais paņēmiens bez šķīdinātājiem. Šajā metodē ar polimēru pārklātu šķiedru eksponē gāzes vai šķidrajai fāzei, kas satur interesējošo analizējamo vielu. Parasti izmanto minimālu analīzes laiku, lai starp cietajām un šķidrajām fāzēm panāktu stacionāro fāzi, ņemot vērā mērīto sugu. Pēc tam interesējošās analizējamās vielas koncentrāciju var noteikt tieši no šķiedras vai pēc tās ekstrahēšanas no šķiedras šķīdinātājā atkarībā no noteikšanas paņēmiena.

Testējamās vielas zivs organismā grafiskajā attēlojumā stacionārā fāze (C_f) attiecībā pret laiku ir sasniegta tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trim pēc kārtas veiktām C_f analīzēm ar paraugiem, kas ņemti ar vismaz divu dienu starplaikiem, savstarpējā sakritība ir ± 20 % robežās, un laikā starp pirmo un pēdējo secīgo analīzi nav novērojams būtisks C_f pieaugums. Analizējot apvienotus paraugus, ir vajadzīgas vismaz četras sekojošas analīzes. Testējamām vielām, ko uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas.

Līdzsvara biokoncentrēšanās koeficients (BCF_{SS}) ilgākā laikā būtiski nemainās, ja testējamās vielas koncentrācija apkārtējā vidē šajā laikā ir konstanta (sal. ar "stacionārās fāzes" definīciju).

Kopējā organiskā oglekļa saturs (*TOC*) ir koncentrācijas mērs ogleklim, kas testa vidē radies no visiem organiskajiem avotiem, tostarp daļiņu avotiem un izšķīdušiem avotiem.

Uzņemšanas ātruma konstante (k_1) ir skaitliska vērtība, kas nosaka testējamās vielas koncentrācijas pieauguma ātrumu testa zivju organismā vai uz to virsmas (vai konkrētos to audos), ja zivis ir eksponētas šai vielai (k_1 izsaka l kg^{-1} $dienā^{-1}$).

Vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kuras ir kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli, sauc par *UVCB*.

▼**M7**

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Šā pielikuma A.8. nodaļa *"Sadalījuma koeficients (oktanola–ūdens):" kolbu kratīšanas "metode"*.

(3) Šā pielikuma A.24. nodaļa *"Sadalījuma koeficients (oktanola–ūdens): HPLC metode"*.

(4) Šā pielikuma A.23. nodaļa *"Sadalījuma koeficients (1-oktanola–ūdens): lēnās maisīšanas metode"*.

▼M7

2. papildinājums

TESTA NOSACĪJUMI, ILGUMS UN IZDZĪVOTĪBAS KRITĒRIJI IETEICAMAJĀM SUGĀM

Komponents	Robežkoncentrācija
Suspendētās daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizētais amonjaks	1 µg/l
Hlora atlikumi	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

▼M7

3. papildinājums

TESTĒŠANAI IETEICAMĀS ZIVJU SUGAS

Ieteicamās sugas	Ieteicamais testēšanas temperatūras diapazons (°C)	Ieteicamais kopējais testa dzīvnieku garums (cm) (2)
Danio rerio (1) (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (*Hamilton-Buchanan*) Zebrzivs	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (*Rafinesque*) Melngalvas mailīte	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (*Teleostei*, *Cyprinidae*) (*Linnaeus*) Parastā karpa	20 – 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (*Teleostei, Poecilliidae*) (*Temminck* un *Schlegel*) Rīsu zivs	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei*, *Poeciliidae*) (*Peters*) Gupija	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei Centrarchidae*) (*Rafinesque*) Zilais saulesasaris	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (*Teleostei Salmonidae*) (*Walbaum*) Varavīksnes forele	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (*Teleostei*, (*Gasterosteidae*) (*Linnaeus*) Trīsadatu stagars	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Jāpiebilst, ka pašā testā vēlamais mērs iegūtajām izmēra un augšanas ātruma konstantēm ir svars. Tomēr tiek atzīts, ka garumu izmantot ir praktiskāk, ja eksperimenta sākumā zivs jāizraugās vizuāli (*t. i.*, no pamatgrupas).

(3) Šis garuma diapazons ir norādīts dokumentā "Testing Methods for New Chemical Substances" utt., pamatojoties uz Japānas likumu par ķīmisko vielu kontroli (*CSCL*).

Mazāk plaši izmantotas dažādas upju grīvu un jūras zivju sugas, piemēram:

Punktotā bungzivs	(*Leiostomus xanthurus*)
Lāsumainais jūrasgrundulis	(*Cyprinodon variegatus*)
Saldūdens menīdija	(*Menidia beryllina*)
Zeltainais jūrasasaris	(*Cymatogaster aggregata*)
Kalifornijas jūrasmēle	(*Parophrys vetulus*)
Ziemeļatlantijas ragainā buļļzivs	(*Leptocottus armatus*)
Trīsadatu stagars	(*Gasterosteus aculeatus*)
Jūras asaris	(*Dicentracus labrax*)
Vīķe	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Tabulā norādītās saldūdens zivis ir viegli audzējamas un/vai viegli pieejamas visu gadu, savukārt jūras un upju grīvu zivis daļēji ir iegūstamas attiecīgajās valstīs. Tās var audzēt un kultivēt vai nu zivjaudzētavās, vai laboratorijā slimību un parazītu kontroles apstākļos, tā, lai testa dzīvnieki būtu veseli un ar zināmu izcelsmi. Šīs zivis ir pieejamas daudzviet pasaulē.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

4. papildinājums

PARAUGOŠANAS GRAFIKI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS UN BARĪBEKSPOZĪCIJAS TESTIEM

1. **Teorētisks piemērs paraugošanas grafikam pilnā ūdensekspozīcijas biokoncentrēšanās testā vielai ar log K_{OW} = 4.**

Zivju paraugošana	Paraugošanas laika grafiks		Ūdens paraugu skaits (1)	Zivju skaits paraugā (1)
	Minimālais vajadzīgais biežums (dienas) (2)	Papildu paraugošana (dienas) (2)		
Uzņemšanas fāze				
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))
Izvadīšanas fāze				Zivis pārvieto ūdenī, kas nesatur testējamo vielu
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))
KOPĀ				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Skaitļi iekavās ir paraugu skaits (ūdenim, zivīm), kas jāņem, ja tiek veikta papildu paraugošana.

(2) Pirmspārbaudes skaitliski novērtētais k_2 pie log K_{OW} lieluma 4,0 ir 0,652 dienas^{-1}. Kopējais eksperimenta ilgums ir noteikts 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dienas, *t. i.*, 14 dienas. "t_{SS}" aplēses noteikšanu sk. 5. papildinājumā.

(3) Ūdens paraugu ņem pēc tam, kad pievadīti vismaz 3 "kameru tilpumi" ūdens.

(4) Šīs zivis paraugo no pamatgrupas.

(5) Ja nepieciešama lielāka precizitāte vai metabolisma pētījumi, kuros nepieciešams vairāk zivju, tās jāparaugo tieši uzņemšanas un izvadīšanas fāžu beigās (sal. ar 40. punktu).

(6) Ja nav iespējams izmantot to pašu zivi, kas vielu koncentrāciju noteikšanai paraugota testa sākumā, uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes beigās, lipīdsatura analīzei var būt nepieciešamas vismaz 3 papildu zivis. Jāņem vērā, ka daudzos gadījumos iespējams izmantot vienīgi 3 kontroles zivis (sal. ar 56. punktu).

▼M7

2. **Teorētisks piemērs uzturiska bioakumulācijas testa paraugošanas grafikam pēc 10 dienu ilgas vielas uzņemšanas un 42 dienu ilgas izvadīšanas fāzes.**

Paraugošanas notikums	Paraugošanas laika grafiks		Barības paraugu skaits	Zivju skaits paraugā	
	Fāzes diena	Vai jāizmanto papildu zivju paraugi?		Testgrupa	Kontrolgrupa
Uzņemšanas fāze					
1	0	Iespējams (1) (2)	3 – testgrupa	0	5 – 10
			3 – kontrolgrupa (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Jā (4)	3 – testgrupa	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – kontrolgrupa (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Izvadīšanas fāze					
3	1	Jā (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Jā (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Jā (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
KOPĀ				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) Gan no kontrolgrupas, gan testgrupas 3 barības paraugi, kas analizēti attiecībā uz testējamās vielas koncentrācijām un lipīdsaturu.
(2) Zivis paraugo no pamatgrupas iespējami tuvu pētījuma sākumam; testa sākumā attiecībā uz lipīdsaturu jāparaugo vismaz 3 zivis no pamatgrupas.
(3) (Pēc izvēles veikta) paraugošana uzņemšanas fāzes agrīnā posmā nodrošina datus, no kuriem aprēķināt tādu testējamās vielas uzturasimilāciju, ko var salīdzināt ar asimilācijas efektivitāti, kas aprēķināta no izvadīšanas fāzes datiem.
(4) Papildu 5 zivis var paraugot, lai veiktu audiem specifisku analīzi.
(5) Ja nav iespējams izmantot to pašu zivi, kas vielu koncentrāciju noteikšanai paraugota testa sākumā, uzņemšanas fāzes beigās un izvadīšanas fāzes beigās, lipīdsatura analīzei var būt nepieciešamas vismaz 3 papildu zivis. Jāņem vērā, ka daudzos gadījumos ir iespējams izmantot tikai 3 kontroles zivis (sal. ar 56. un 153. punktu).

Piebilde par fāžu un paraugošanas laikiem. Uzņemšanas fāze sākas ar pirmo papildinātās barības došanas reizi. Eksperimenta diena sākas ar pirmo barošanas reizi un beidzas pēc 24 stundām, neilgi pirms nākamās barošanas reizes. Pirmā paraugošana (tabulā apzīmēta ar 1) jāveic neilgi (piemēram, vienu stundu) pirms pirmās barošanas reizes. Ideālā gadījumā paraugošana pētījuma laikā jāveic neilgi pirms nākamajā dienā paredzētās barošanas (*t. i.*, apmēram 23 stundas pēc barošanas paraugošanas dienā). Uzņemšanas fāze beidzas neilgi pirms pirmās reizes, kad dod nepapildinātu barību, un tad sākas izvadīšanas fāze (nākamās 24 stundas pēc pēdējās barošanas ar papildināto barību testgrupas zivis, visticamāk, vēl sagremos papildināto barību). Tas nozīmē, ka izvadīšanas beigu paraugs jāņem neilgi pirms pirmās barošanas ar papildināto barību un pirmās izvadīšanas fāzes paraugs jāņem apmēram 23 stundas pēc pirmās barošanas ar papildināto barību.

▼M7

5. papildinājums

VISPĀRĪGI APRĒĶINI

1. Ievads

2. Prognozes par uzņemšanas fāzes ilgumu

3. Prognozes par izvadīšanas fāzes ilgumu

4. Secīgā metode: izvadīšanas (zuduma) ātruma konstantes k2 *noteikšana*

5. Secīgā metode: uzņemšanas ātruma *konstantes* k1 noteikšana (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)

6. Vienlaicīgā metode uzņemšanas un izvadīšanas (zuduma) ātruma konstanšu aprēķināšanai (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)

7. Augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšana kinētiskajam BCF un BMF

8. Lipīdu normalizācija līdz lipīdsaturam 5 % (vienīgi ūdensekspozīcijas metodei)

1. IEVADS

Vispārīgo zivju ūdens bioakumulācijas modeli var aprakstīt kā uzņemšanas un zuduma procesus, neņemot vērā uzņemšanu ar barību. Diferenciālais vienādojums (dC_f/dt), kas raksturo ātrumu, ar kādu mainās koncentrācija zivs organismā (mg uz·kg^{-1}·dienā$^{-1}$), ir sniegts turpmāk (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Vienādojums A5.1.]}$$

Kur

k_1 = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz uzņemšanu zivs organismā (l·kg^{-1}·dienā$^{-1}$).

k_2 = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz izvadīšanu no zivs organisma (dienā$^{-1}$).

k_g = pirmās pakāpes ātruma konstante attiecībā uz zivs augšanu ("augšanas izraisīts atšķaidījums") (dienā$^{-1}$).

k_m = pirmās pakāpes konstante attiecībā uz metabolisko transformāciju (dienā$^{-1}$).

k_e = pirmās pakāpes konstante attiecībā uz izkārnījumu defekāciju (dienā$^{-1}$).

C_w = koncentrācija ūdenī (mg·l^{-1}).

C_f = koncentrācija zivs organismā (mg·uz kg^{-1} slapjsvara).

Var paredzēt, ka vielām, kas bioakumulējas, visbūtiskākā ekspozīcijas koncentrācija ūdenī (C_w) pieļaujamā svārstību diapazonā ir laikā svērtā vidējā vērtība (*TWA*) (sal. ar 24. punktu). *TWA* koncentrāciju ūdenī ieteicams aprēķināt saskaņā ar TM C.20. 6. papildinājumā norādīto procedūru (2). Jāpiebilst, ka ūdens koncentrācijas ln transformācija ir piemērota, kur starp atjaunošanās periodiem sagaidāmi eksponenciāli traucējumi, piemēram, pusstatiskā testa plānā. Caurplūdes sistēmā ekspozīcijas koncentrāciju ln transformācija var nebūt vajadzīga. Ja tiek atvasinātas *TWA* koncentrācijas ūdenī, tās jānorāda pārskatā un jāizmanto turpmākajos aprēķinos.

Standarta zivs *BCF* testā uzņemšanu un izvadīšanu var raksturot kā divus pirmās pakāpes kinētiskos procesus.

▼M7

Uzņemšanas ātrums = $k_1 \times C_w$ [Vienādojums A5.2.]

Kopējais izvadīšanas ātrums = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Vienādojums A5.3.]

Stacionārā fāzē, pieņemot, ka augšana un metabolisms ir niecīgi (t. i., ka k_g un k_m vērtības nav iespējams atšķirt no nulles), uzņemšanas ātrums ir vienāds ar izvadīšanas ātrumu, un līdz ar to vienādojuma A5.2. un vienādojuma A5.3. kombinēšana dod šādu sakarību:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Vienādojums A5.4.]

Kur

$C_{f\text{-}SS}$ = koncentrācija zivs organismā stacionārajā fāzē (mg uz kg^{-1} slapjsvara).

$C_{w\text{-}SS}$ = koncentrācija ūdenī stacionārajā fāzē (mg l^{-1}).

Koeficients k_1/k_2 ir pazīstams kā kinētiskais *BCF* (BCF_K), un tam jābūt vienādam ar stacionārās fāzes *BCF* (BCF_{SS}), kas iegūts no stacionārās fāzes koncentrācijas zivs organismā attiecībā pret koncentrāciju ūdenī, bet, ja stacionārā fāze nav skaidra vai ja kinētiskais *BCF* ir koriģēts ar augšanu, var rasties novirzes. Tomēr, tā kā k_1 un k_2 ir konstantes, BCF_K var atvasināt, stacionāro fāzi nesasniedzot.

Pamatojoties uz šiem pirmās pakāpes vienādojumiem, šajā 5. papildinājumā ir iekļauti vispārīgie aprēķini, kas vajadzīgi gan ūdensekspozīcijas, gan uzturekspozīcijas bioakumulācijas metodēm. Tomēr 5., 6. un 8. iedaļa ir būtiskas tikai ūdensekspozīcijas metodei, bet šeit ir iekļautas kā "vispārīgi" paņēmieni. Secīgā (4. un 5. iedaļa) un vienlaicīgā (6. iedaļa) metode dod iespēju aprēķināt uzņemšanas un izvadīšanas konstantes, kuras izmanto, lai iegūtu kinētisko *BCF*. Secīgā metode k_2 noteikšanai (4. iedaļa) ir svarīga attiecībā uz uzturmetodi, jo tā vajadzīga gan asimilācijas efektivitātes, gan *BMF* aprēķināšanai. 7. papildinājumā ir izklāstīti uzturmetodei specifiski aprēķini.

2. PROGNOZES PAR UZŅEMŠANAS FĀZES ILGUMU

Pirms veikt testu, no empīriskām sakarībām starp k_2 un *n*-oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu (K_{OW}) vai starp k_1 un *BCF* var aplēst k_2, un attiecīgi aptuvenu procentuālu daļu no laika, kas vajadzīgs stacionārās fāzes sasniegšanai. Tomēr jāsaprot, ka šajā iedaļā norādītie vienādojumi ir izmantojami tikai tad, ja uzņemšanā un izvadīšanā ievērota pirmās pakāpes kinētika. Ja tā noteikti nav un ja vēlams iegūt prognozes par uzņemšanas fāzi, ieteicams lūgt biostatistikas un/vai farmakokinētikas speciālista padomu.

Aplēsi par k_2 (dienā$^{-1}$) var iegūt ar vairākām metodēm. Piemēram, pirmkārt, var izmantot šādas empīriskās sakarības ([1])

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); vienādojums A5.5.]

vai

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Vienādojums A5.6.]

Kur $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (vielām ar $\log K_{OW} > 3$) (r2 = 0.,5) [(4); Vienādojums A5.7.]

([1]) Tāpat kā ar jebkuru empīrisku sakarību, jāpārbauda, vai testējamā viela ietilpst šīs sakarības izmantojamības jomā.

▼M7

Un $BCF = 10^{(0,910 \cdot logK_{OW} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0,786)}$ (r2 = 0,90) [(5); Vienādojums A5.8.]

W = vidējais apstrādātais zivs svars (grami slapjsvara) uzņemšanas beigās/izvadīšanas sākumā ([1])

Citas saistītās sakarības sk. (6). Var būt lietderīgi k_2 aplēsēs iesaistīt sarežģītākus modeļus, ja, piemēram, sagaidāms, ka būs ātra metabolizēšanās (7) (8). Tomēr, modelim kļūstot sarežģītākam, vairāk jārūpējas par prognožu interpretāciju. Piemēram, nitrogrupu klātbūtne var norādīt uz ātru metabolizēšanos, bet tā nav vienmēr. Tādēļ, plānojot pētījumu, lietotājam jāizvērtē prognozes metodes rezultāti attiecībā pret ķimikālijas struktūru un cita saistoša informācija (piemēram, iepriekšēji pētījumi).

Laiku, kas nepieciešams, lai sasniegtu noteiktu procentuālo daļu no stacionārās fāzes, var iegūt, izmantojot k_2 aplēsi no vispārīgā kinētiskā vienādojuma, kas raksturo uzņemšanu un izvadīšanu (pirmās pakāpes kinētika), pieņemot, ka augšana un metabolisms ir niecīgi. Ja pētījuma laikā novērojama būtiska augšana, turpmāk aprakstītās aplēses nebūs ticamas. Tādos gadījumos labāk izmantot tālāk tekstā aprakstīto ar augšanu koriģētu k_{2g} (sk. šā papildinājuma 7. iedaļu):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f$$ [Vienādojums A5.9.]

vai, ja C_w ir nemainīgs:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t})$$ [Vienādojums A5.10.]

Tuvojoties stacionārajai fāzei (t- → ∞), vienādojumu A5.10. var reducēt šādi (sal.ar (9) (10)):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W$$ [Vienādojums A5.11.]

vai

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF$$ [Vienādojums A5.12.]

Tad BCF × C_w ir aptuvināta koncentrācija zivju organismā stacionārajā fāzē ($C_{f\text{-}SS}$). [Piezīme: tādu pašu pieeju var izmantot, aplēšot stacionārās fāzes *BMF* uzturtestā. Šajā gadījumā iepriekš norādītajos vienādojumos *BCF* aizstāj ar *BMF* un C_w ar C_{food}, koncentrāciju barībā]

Vienādojumu A5.10. var pierakstīt šādi:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t})$$ [Vienādojums A5.13.]

vai

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t}$$ [Vienādojums A5.14.]

Piemērojot vienādojumu A5.14., stacionārās fāzes noteiktas procentuālās daļas sasniegšanai nepieciešamo laiku var prognozēt, ja k_2 ir iepriekš noteikts, izmantojot vienādojumu A5.5. vai vienādojumu A5.6.

Orientieris attiecībā uz statistiski optimālu uzņemšanas fāzes ilgumu statistiski pieņemamu datu (BCF_K) iegūšanai ir laiks, kas vajadzīgs, lai logaritmiskā līkne, kas atlikta pret lineāro laiku un raksturo testējamās vielas koncentrāciju

([1]) Zivs svaru uzņemšanas fāzes beigās var aplēst no iepriekšēju pētījumu datiem vai zināšanām par testējamo sugu izmēra iespējamo pieaugumu no tipiskā testa sākuma svara attiecībā pret tipisku uzņemšanas ilgumu (piemēram, 28 dienas).

▼M7

zivju organismā sasniegtu vismaz 50 % no stacionārās fāzes (*t. i.*, $0{,}69/k_2$), bet ne vairāk par 95 % no stacionārās fāzes (*t. i.*, $3{,}0/k_2$)(11). Ja akumulācija pārsniedz 95 % stacionārās fāzes, ir iespējams aprēķināt BCF_{SS}.

Laiks, kas nepieciešams 80 % stacionārās fāzes sasniegšanai (izmantojot vienādojumu A5.14.), ir:

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t}$$ [Vienādojums A5.15.]

vai

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2}$$ [Vienādojums A5.16.]

Līdzīgi laiks, kurā sasniedz 95 % stacionārās fāzes, ir:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$ [Vienādojums A5.17.]

Piemēram, uzņemšanas fāzes ilgums (*t. i.*, laiks, lai sasniegtu noteiktu stacionārās fāzes procentuālo daļu, piemēram t_{80} vai t_{95}) testējamai vielai ar log K_{OW} = 4 būtu (izmantojot vienādojumu A5.5., vienādojumu A5.16. un vienādojumu A5.17.):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dienā}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\text{dienas (59 stundas)}$$

$$\text{vai } t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60 \textit{ dienas}(110 \text{ stundas})$$

Alternatīvā gadījumā vienādojumu

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \text{ (}stundas\text{)}$$ [Vienādojums A5.18]

var izmantot, lai aprēķinātu laiku, kas vajadzīgs faktiskas stacionārās fāzes (t_{eSS}) sasniegšanai (12). Līdz ar to testējamai vielai ar log K_{OW} = 4 rezultāts būs šāds:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121 \textit{ stundas}$$

3. PROGNOZES PAR IZVADĪŠANAS FĀZES ILGUMU

Prognozi par laiku, kas nepieciešams, lai slogu organismā samazinātu līdz noteiktai sākotnējās koncentrācijas daļai, var iegūt no vispārīgā vienādojuma, kas apraksta uzņemšanu un izvadīšanu (pieņemot pirmās pakāpes kinētiku, sal. ar vienādojumu A5.9. (1) (13).

Izvadīšanas fāzei pieņem, ka C_w (vai uzturtestam C_{food}) ir nulle. Vienādojumu var reducēts līdz:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f$$ [Vienādojums A5.19.]

vai

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$ [Vienādojums A5.20.]

Kur $C_{f,0}$ ir koncentrācija izvadīšanas perioda sākumā.

50 % izvadīšanu sasniedz laikā (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

vai

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Līdzīgi 95 % izvadīšanu sasniedz laikā:

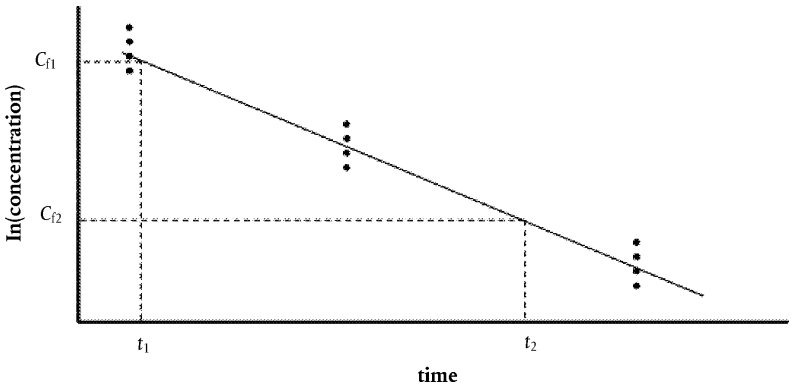
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Ja pirmajam posmam tiek izmantota uzņemšana 80 % ($1{,}6/k_2$) un izvadīšanas fāzē zudums 95 % ($3{,}0/k_2$), izvadīšanas fāze ir aptuveni divreiz ilgāka par uzņemšanas fāzi.

Jāpiebilst, ka šīs aplēses ir balstītas uz pieņēmumu, ka uzņemšanas un izvadīšanas modeļi atbilst pirmās pakāpes kinētikai. Ja tie acīmredzami neatbilst pirmās pakāpes kinētikai, šīs aplēses nav derīgas.

4. SECĪGĀ METODE: IZVADĪŠANAS (ZUDUMA) ĀTRUMA KONSTANTES K_2 NOTEIKŠANA

Tiek uzskatīts, ka lielāko daļu biokoncentrēšanās datu "pietiekami labi" apraksta vienkāršs divu nodalījumu/divu parametru modelis, ko atspoguļo rektilineārā līkne, kas izvadīšanas fāzē aptuvināta punktiem, kuri atbilst koncentrācijām zivju organismā (ln skalā).



Jāņem vērā, ka novirzes no taisnas līnijas var liecināt par sarežģītāku izvadīšanas sistēmu, nevis pirmās pakāpes kinētiku. Lai iegūtu atrisinājumu par izvadīšanas veidiem, kas neatbilst pirmās pakāpes kinētikai, var izmantot grafisko metodi.

Lai vairākiem laika (paraugošanas) punktiem aprēķinātu k_2, jāizdara ln(koncentrācija) lineāra regresija attiecībā pret laiku. Regresijas līnijas stāvums ir izvadīšanas ātruma konstantes k_2 aplēse ([1]). No vienādojuma brīvā locekļa viegli iespējams aprēķināt (arī kļūdu robežas) vidējo koncentrāciju zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā ($C_{0,d}$; kas ir vienāda ar vidējo koncentrāciju zivs organismā uzņemšanas fāzes beigās) ([1]):

([1]) Vairumā programmu, kas pieļauj lineāras regresijas, aplēsēm ir sniegtas arī standartkļūdas un ticamības intervāli (TI), piemēram, *Microsoft Excel* formātā, izmantojot *Data Analysis* instrumentu paku.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$ [Vienādojums A5.21.]

Lai aprēķinātu k_2, kad ir pieejami tikai divi laika (paraugošanas) punkti (kā tas ir minimizētajā plānā), abas vidējās koncentrācijas aizstāj ar šādu vienādojumu:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2}\ -\ t_1}$$ [Vienādojums A5.22.]

kur $\ln(C_{f1})$ un $\ln(C_{f2})$ ir koncentrāciju naturāllogaritmi attiecīgi laikā t_1 un t_2, un t_2 un t_1 ir abu paraugu ievākšanas laiks attiecībā pret izvadīšanas sākumu ([1]).

5. SECĪGĀ METODE: UZŅEMŠANAS ĀTRUMA KONSTANTES K_1 NOTEIKŠANA (TIKAI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

Lai, ņemot vērā secīgā laika koncentrācijas datu kopumu uzņemšanas fāzē, iegūtu vērtību k_1, jāizmanto datorprogramma, lai pielāgotos šādam modelim:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t})$$ [Vienādojums A5.23.]

kur k_2 ir iegūts no iepriekšējā aprēķina, $C_f\,(t)$ un $C_w\,(t)$ ir koncentrācijas zivju organismā un ūdenī, proti, laikā t.

Lai aprēķinātu k_1, kad ir pieejami tikai divi laika (paraugošanas) punkti (kā tas ir minimizētajā plānā), jāizmanto šāda formula:

$$k_1 = \frac{C_{\ f}\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})}$$ [Vienādojums A5.24.]

Šajā formulā k_2 ir iegūts no iepriekšējā aprēķina, C_f ir koncentrācija zivs organismā izvadīšanas fāzes sākumā, bet C_w ir vidējā koncentrācija ūdenī uzņemšanas fāzes laikā ([2]).

Lai noteiktu, cik laba bijusi pielāgošana, var izmantot grafiski attēloto k_1 un k_2 līkņu stāvuma vizuālo pārbaudi attiecībā pret izmērīto parauga punktu. Ja secina, ka ar secīgo metodi iegūtās k_1 aplēses nav pilnīgas, k_1 un k_2 aprēķināšanā jāizmanto vienlaicīgā pieeja (sk. tālāk 6. iedaļu). Rezultātā iegūtais līkņu stāvums vēlreiz jāsalīdzina ar grafiski attēlotajiem izmērītajiem datiem, lai vizuālajā pārbaudē noteiktu pielāgotību. Ja pielāgotība joprojām nav pilnīga, tas var liecināt, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama un ka jāizmanto citi sarežģītāki modeļi.

6. VIENLAICĪGĀ METODE UZŅEMŠANAS UN IZVADĪŠANAS (ZUDUMA) ĀTRUMA KONSTANŠU APRĒĶINĀŠANAI (TIKAI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

Izmantojot secīgā laika koncentrācijas datu kopumu un modeli, ar datorprogrammu palīdzību var iegūt k_1 un k_2 vērtības:

$$C_f = C_{\ w}\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c$$ [Vienādojums A5.25.]

$$C_f = C_{\ w}\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2(t\ -\ t_c)}\ - e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c$$ [Vienādojums A5.26.]

kur

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās.

Šī pieeja tiešā veidā nodrošina standartkļūdas k_1 un k_2 aplēsēm. Vienādojumā A5.25. un vienādojumā A5.26. k_1/k_2 aizstājot ar *BCF* (sal. ar vienādojumu A5.4.), iespējams aplēst arī standartkļūdu un *BCF* 95 % TI. Tas ir īpaši

([1]) Pretēji lineārās regresijas metodei šīs formulas izmantošana attiecībā uz k2 neradīs standartkļūdu.

([2]) Pretēji lineārās pielāgošanas procedūrai šī metode parasti neradīs standartkļūdu vai ticamības intervālu aplēstajam k1.

▼M7

lietderīgi, salīdzinot datu transformācijas rezultātā iegūtas dažādas aplēses. Atkarīgo mainīgo (koncentrāciju zivs organismā) var pielāgot ar vai bez ln transformācijas, un var izvērtēt iegūtā *BCF* nenoteiktību.

Tā kā, ja aplēses tiek veiktas vienlaicīgi, abi parametri k_1 un k_2 spēcīgi korelē, var būt ieteicams vispirms aprēķināt k_2 vienīgi no izvadīšanas datiem (sk. iepriekš); k_2 lielākajā daļā gadījumu var salīdzinoši precīzi aplēst no izvadīšanas līknes. Pēc tam k_1 var aprēķināt no uzņemšanas datiem, izmantojot nelineāru regresiju ([1]). Secīgai pielāgošanai ieteicams izmantot tādu pašu datu transformāciju.

Pielāgotību var noteikt, zezultātā iegūto grafiski attēloto līkņu stāvumu vizuāli pārbaudot attiecībā pret izmērīto parauga punktu. Ja tiek secināts, ka ar šo metodi iegūtā $_k1$ aplēse nav pilnīga, k_1 un k_2 aprēķināšanā var izmantot vienlaicīgo pieeju. Pielāgotais modelis vēlreiz jāsalīdzina pret grafiski attēlotajiem mērītajiem datiem, lai vizuāli pārbaudītu pielāgotību, un jāsalīdzina dažāda veida pielāgojumos iegūtās k_1, k_2 un *BCF* parametru aplēses, to standartkļūdas un/vai ticamības intervāli.

Ja pielāgotība nav pilnīga, tas var liecināt, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama un jāiesaista citi sarežģītāki modeļi. Viena no visizplatītākajām problēmām ir zivju augšana testa laikā.

7. KINĒTISKĀ *BCF* UN *BMF* KORIĢĒŠANA AR AUGŠANAS IZRAISĪTU ATŠĶAIDĪJUMU

Šajā iedaļā aprakstīta standartmetode korekcijai, kas jāveic sakarā ar zivju augšanu testa laikā (tā saucamais "augšanas izraisīts atšķaidījums") un ir derīga vienīgi tad, ja novērojama pirmās pakāpes kinētika. Ja ir liecības, ka pirmās pakāpes kinētika nav izmantojama, par augšanas izraisīta atšķaidījuma pienācīgu koriģēšanu ieteicams lūgt biostatistikas speciālista padomu vai izmantot turpmāk aprakstīto uz masu balstīto pieeju.

Dažos gadījumos šī augšanas izraisīta atšķaidījuma koriģēšanai paredzētā metode nav precīza vai nedarbojas (piemēram, ļoti lēni izvadītām vielām, kuras testē ātri augošās zivīs, iegūtā izvadīšanas ātruma konstante k_{2g}, kas koriģēta atbilstīgi augšanas izraisītajam atšķaidījumam, var būt ļoti maza un līdz ar to izšķiroši svarīga kļūst kļūda abās ātruma konstantēs, kas izmantotas tās iegūšanai, un dažos gadījumos k_g aplēses var pārsniegt k_2). Tādos gadījumos var izmantot alternatīvu pieeju (*t. i.*, masas pieeju), kura darbojas arī tad, kad pirmās pakāpes kinētika nav novērojama, un kuras gadījumā nav jāveic korekcija. Šī pieeja ir izklāstīta šīs iedaļas beigās.

Augšanas ātruma konstantes subtrakcijas metode koriģēšanai ar augšanu

Standartmetodei visus individuālos datus par svaru un garumu konvertē naturāllogaritmos un atsevišķi apstrādgrupām un kontrolgrupām ln(svars) vai ln(1/svars) grafiski attēlo pret laiku (diena). Vienu un to pašu procesu atsevišķi veic ar uzņemšanas un izvadīšanas fāžu datiem. Koriģēšanā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, lai iegūtu augšanas ātruma konstanti (k_g), parasti

([1]) Jāsaprot, ka k2 aplēses mainīgums bioakumulācijas modelī netiek pienācīgi izmantots, ja tā tiek būtībā uzskatīta par nemainīgu, veicot k1 pielāgošanu secīgās piemērotības metodē. Līdz ar to vienlaicīgās un secīgās piemērotības metodēs iegūtais *BCF* mainīgums būs atšķirīgs.

▼M7

vislabāk izmantot visa pētījuma datus par svaru, bet statistiski būtiskas atšķirības starp uzņemšanas fāzei un izvadīšanas fāzei atvasinātajām augšanas ātruma konstantēm var liecināt, ka jāizmanto izvadīšanas fāzes ātruma konstante. Jebkādu ar apstrādi saistītu ietekmi var pārbaudīt, izmantojot ūdensekspozīcijas pētījumu testgrupu un kontrolgrupu kopējos augšanas ātrumus.

Katrai grupai (testgrupa(-s) un kontrolgrupas, atsevišķi dati, vidējās vērtības, kas netiek iegūtas katru dienu) lineāro mazāko kvadrātu korelāciju ln(zivs svars) attiecībā pret dienu (un ln(1/svars) attiecībā pret dienu) visam pētījumam, uzņemšanas un izvadīšanas fāzēm, aprēķina, izmantojot statistiskas standartprocedūras. Līniju stāvuma dispersijas aprēķina un izmanto, lai izvērtētu stāvuma atšķirību (augšanas ātruma konstantes) statistisko nozīmību (p = 0,05), izmantojot Stjūdenta t-testu (vai, ja testē vairāk nekā vienu koncentrāciju, *ANOVA*). Lai izdarītu korekciju ar augšanu, parasti vislabāk izmantot datus par svaru. Tāpat apstrādāti dati par garumu var noderēt, lai attiecībā uz apstrādes radīto ietekmi salīdzinātu kontrolgrupas un testgrupas. Ja svara datu analīzē statistiski nozīmīgas atšķirības nav vērojamas, testa un kontroles datus var apkopot un pētījuma kopējo zivs augšanas ātruma konstanti (k_g) var aprēķināt kā kopējo lineārās korelācijas stāvumu. Ja tiek novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības, augšanas ātruma konstantes katrai zivju grupai un/vai pētījuma fāzei norāda atsevišķi. Pēc tam ātruma konstanti no katras apstrādātās grupas izmanto, lai attiecīgajā grupā veiktu korekciju ar augšanas izraisītu atšķaidījumu. Ja starp uzņemšanas un izvadīšanas fāžu ātruma konstantēm tiek pamanītas statistiskas atšķirības, jāizmanto no izvadīšanas fāzes iegūtās ātruma konstantes.

Aprēķināto augšanas ātruma konstanti (k_g, izteikta kā diena^{-1}) var atņemt no kopējās izvadīšanas ātruma konstantes (k_2), lai iegūtu izvadīšanas ātruma konstanti k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Vienādojums A5.27.]}$$

Uzņemšanas ātruma konstanti dala ar augšanas koriģētu izvadīšanas ātruma konstanti, lai iegūtu ar augšanu koriģētu kinētisko *BCF*, ko apzīmē kā BCF_{Kg} (vai BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Vienādojums A5.28.]}$$

Ar barību saistītam pētījumam iegūtu augšanas ātruma konstanti izmanto vienādojumā A7.5., lai aprēķinātu ar augšanu koriģētu BMF_{Kg} (sal. ar 7. papildinājumu).

Uz masu balstīta augšanas koriģēšanas metode

Iepriekš norādītās "augšanas ātruma konstantes subtrakcijas metodes" alternatīvu, saskaņā ar kuru nav jākoriģē augšanas ātrums, var izmantot, kā norādīts turpmāk. Tās princips ir izmantot uz masu balstītus izvadīšanas datus no veselas zivs, nevis pamatojoties uz koncentrāciju.

Izvadīšanas fāzes audu koncentrācijas (testējamās vielas masa/zivs vienības masa) konvertē testējamās vielas/zivs masā: tabulas veidā (piemēram, izmantojot izklājlapu datorā) saskaņo koncentrācijas un individuālos zivju svarus un katru koncentrāciju sareizina ar kopējo zivju svaru, lai mērījumā visiem izvadīšanas fāzes paraugiem tiktu iegūts testējamās vielas/zivs masas kopums.

Grafiski attēlo rezultātā iegūto vielas masas datu naturāllogaritmu attiecībā pret eksperimenta laiku (izvadīšanas fāze), kā tas parasti tiktu darīts.

▼M7

Attiecībā uz ūdensekspozīcijas metodi regulāri iegūst uzņemšanas ātruma konstanti (sk. 4. un 6. sadaļu), jāņem vērā, ka līknes pielāgošanas vienādojumos jāizmanto "normāla" k_2 vērtība attiecībā uz k_1) un no iepriekš norādītajiem datiem iegūst izvadīšanas ātruma konstanti. Tā kā rezultātā iegūto izvadīšanas ātruma konstantes vērtību augšana neietekmē, jo tā tika iegūta, pamatojoties uz veselas zivs masu, tā jānorāda kā k_{2g}, nevis k_2.

8. LIPĪDU NORMALIZĀCIJA LĪDZ LIPĪDSATURAM 5 % (VIENĪGI ŪDENSEKSPOZĪCIJAS METODEI)

No ūdensekspozīcijas testiem iegūti *BCF* (kinētiski un līdzsvara) arī jānorāda pārskatā attiecībā uz noklusēto zivs lipīdsaturu no 5 % slapjsvara, ja vien nav iespējams apliecināt, ka testējamā viela neakumulējas primāri lipīdos (piemēram, dažas perfluorētas vielas var saistīties ar olbaltumvielām). Dati par koncentrāciju zivju organismā jeb *BCF* jākonvertē, pamatojoties uz slapjsvara lipīdsaturu 5 %. Ja vielas koncentrāciju un lipīdsatura mērīšanai visos paraugošanas punktos tika izmantotas vienas un tās pašas zivis, tad katra individuāli izmērītā koncentrācija zivs organismā jākoriģē pēc attiecīgās zivs lipīdsatura.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Vienādojums A5.29.]}$$

kur

$C_{f,L}$ = ar lipīdiem normalizēta koncentrācija zivī (mg kg^{-1} slapjsvara)

L = lipīdu frakcija (uz slapjsvara bāzes)

C_f = testējamās vielas koncentrācija zivī (mg kg^{-1} slapjsvara)

Ja lipīdu analīze netika veikta visām paraugotajām zivīm, vidējo lipīdu vērtību izmanto, lai normalizētu *BCF*. Attiecībā uz līdzsvara *BCF* jāizmanto vidējā vērtība, kas apstrādgrupā reģistrēta uzņemšanas fāzes beigās. Lai normalizētu kinētisko *BCF*, var būt gadījumi, kad ir pieļaujama citāda pieeja, piemēram, ja uzņemšanas vai izvadīšanas fāzē ievērojami mainījies lipīdsaturs. Tomēr jebkurā gadījumā regulāri jāizmanto tāda barošanas intensitāte, kas samazina krasās lipīdsatura pārmaiņas.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Vienādojums A5.30.]}$$

kur

BCF_{KL} = ar lipīdiem normalizēts kinētiskais *BCF* (L kg^{-1})

L_n = vidējā lipīdu frakcija (pamatojoties uz slapjsvaru)

BCF_K = kinētiskais *BCF* (L kg^{-1})

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna Reproduction Test*.

(3) Spacie A. and 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. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and 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. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and 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. February 2011. Available from: 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. and 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, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and 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. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

6. papildinājums

ŪDENSEKSPOZĪCIJAS TESTA VIENĀDOJUMI: MINIMIZĒTS TESTA PLĀNS

Šīs pieejas pamatojums ir tāds, ka biokoncentrēšanās koeficientu pilnā testā var noteikt kā līdzsvara biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_{SS}), aprēķinot testējamās vielas koncentrācijas koeficienta attiecību zivs audos pret testējamās vielas koncentrāciju ūdenī vai aprēķinot kinētisko biokoncentrēšanās koeficientu (BCF_K) kā uzņemšanas ātruma konstantes k_1 attiecību pret izvadīšanas ātruma konstanti k_2. BCF_K ir derīgs pat tad, ja uzņemšanas laikā nav panākta vielas stacionārās fāzes koncentrācija, ja uzņemšana un izvadīšana nenotiek apmēram saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiskajiem procesiem.

Ja vielas koncentrāciju audos (C_{f1}) mēra, kad ekspozīcija beigusies (t_1), un koncentrāciju audos (C_{f2}) vēlreiz mēra pēc tam, kad ir beidzies laika periods (t_2), izvadīšanas ātruma konstanti (k_2) var aplēst, izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.22.

Pēc tam var algebriski noteikt uzņemšanas ātruma konstanti k_1, izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.23. (kur C_f ir vienāds ar C_{f1} un t ir vienāds ar t_1) (1). Līdz ar to kinētiskās biokoncentrēšanās koeficients minimizētajā plānā (apzīmē ar BCF_{Km}, lai to atšķirtu no kinētiskajiem biokoncentrēšanās koeficientiem, kas noteikti, izmantojot citas metodes) ir šāds:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Vienādojums A6.1.]

Koncentrācijas vai rezultāti jākoriģē saskaņā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu un, kā aprakstīts 5. papildinājumā, jānormalizē pēc zivs lipīdsatura 5 %.

Minimizētais BCF_{SS} ir uzņemšanas fāzes beigās aprēķinātais BCF, pieņemot, ka ir sasniegta stacionārā fāze. Par to var izdarīt vienīgi pieņēmumu, jo ar paraugošanas punktu skaitu nepietiek, lai to pierādītu.

$$\text{minimizētaisBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}}$$ [Vienādojums A6.2.]

Kur

$C_{f\text{-}minSS}$ = koncentrācija zivs organismā pie pieņemtās stacionārās fāzes uzņemšanas beigās (mg kg^{-1} slapjsvara).

$C_{w\text{-}minSS}$ = koncentrācija ūdenī pie pieņemtās stacionārās fāzes uzņemšanas beigās (mg l^{-1}).

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

7. papildinājums

VIENĀDOJUMI BARĪBEKSPOZĪCIJAS TESTAM

1. Piemērotas komerciālās zivju barības sastāvdaļu daudzuma

2. Barības papildināšanas paņēmienu piemēri

3. Asimilācijas efektivitātes un biomagnifikācijas koeficienta aprēķināšana

4. Lipīdu korekcija

5. Atšķirību izvērtējums starp mērīto nulles laika koncentrāciju (C0,m) un iegūto nulles laika koncentrāciju (C0,d)

6. Norādījumi attiecībā uz ļoti strauji izvadītām testējamām vielām

1. PIEMĒROTAS KOMERCIĀLĀS ZIVJU BARĪBAS SASTĀVDAĻU DAUDZUMA PIEMĒRS

Galvenā sastāvdaļa	zivju milti
Kopproteīns	≤ 55,0 %
Koptauki	≤ 15,0 % ([1])
Jēlšķiedra	≥ 2,0 %
Mitrums	≥ 12 %
Pelni	≥ 8 %

([1]) Dažos reģionos var būt iespējams iegūt vienīgi zivju barību ar lipīdu koncentrāciju, kas ir pārāk zema salīdzinājumā ar šo augšējo robežu. Tādos gadījumos pētījumi jāveic ar zemāko lipīdu koncentrāciju piegādātajā barībā un attiecīgi jāpielāgo barošanas intensitāte, lai saglabātu zivju veselību. Lipīdus barībā nedrīkst mākslīgi pavairot, pievienojot papildu eļļu.

2. BARĪBAS PAPILDINĀŠANAS PAŅĒMIENU PIEMĒRI

Vispārīga informācija

Kontrolēm paredzētā barība jāsagatavo tieši tādā pašā veidā kā papildinātā barība, bet nepievienojot testējamo vielu.

Lai pārbaudītu apstrādātās barības koncentrāciju, ar piemērotu ekstrahēšanas metodi jāekstrahē trīs dozētās barības paraugi un ekstraktos jāizmēra testējamās vielas koncentrācija vai radioaktivitāte. Jāpierāda augsta analītiskā atgūstamība (> 85 %) ar zemu mainību starp paraugiem (testa sākumā ņemtajai vielai trīs paraugu koncentrācijas nedrīkst mainīties par vairāk nekā ± 15 % no vidējā lieluma).

Ar barību saistīta testa laikā 0. dienā un uzņemšanas fāzes beigās jāsavāc trīs barības paraugi, lai noteiktu testējamās vielas saturu barībā.

Zivju barības sagatavošana ar šķidru testējamo materiālu (neatšķaidītā veidā)

Apstrādātajai zivju barībai nosaka nominālu testējamo mērķkoncentrāciju, piemēram, 500 μg testējamās vielas/g pārtikas. Atbilstošo neatšķaidītas testējamās vielas daudzumu (ar molmasu vai īpatnējo radioaktivitāti) pievieno zināmajai zivju barības masai stikla burkā vai rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā. Zivju barības masai visā uzņemšanas fāzē jābūt pietiekamai (ņemot vērā

▼M7

nepieciešamību zivju augšanas dēļ katrā barošanas reizē palielināt apjomus). Zivs barība/testējamā viela jājauc visu nakti, lēni maisot (piemēram, izmantojot *roto-rack* tipa maisītāju vai rotāciju, ja tiek izmantota rotācijas ietvaicētāja apaļkolba). Papildinātā barība jāglabā apstākļos, kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā (piemēram, dzesēšana) līdz tās izmantošanai.

Zivju barības sagatavošana, izmantojot kukurūzas vai zivju eļļas nesēju

Cietās testējamās vielas piestā jāsasmalcina smalkā pulverī. Šķidrās testējamās vielas var tieši pievienot kukurūzai vai zivju eļļai. Testējamās vielas izšķīdina zināmā daudzumā kukurūzas vai zivju eļļas (piemēram, 5-15 ml). Dozēto eļļu kvantitatīvā veidā pārvieto atbilstoša izmēra rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā. Dozētās eļļas sagatavošanai izmantotā kolba jāizskalo ar diviem nelieliem eļļas alikvotiem, un tos pievieno apaļkolbai, lai pārliecinātos, ka ir pārvietota visa izšķīdinātā testējamā viela. Lai nodrošinātu eļļas pilnīgu izšķīšanu/dispersēšanu (vai ja pētījumā izmanto vairāk nekā vienu testējamo vielu), pievieno mikromaisītāju, kolbu aizkorķē un maisījumu strauji maisa visu nakti. Testēšanas nolūkam apaļkolbā pievieno pienācīgu daudzumu zivju barības (parasti granulu veidā), un apaļkolbas saturu viendabīgi samaisa, nepārtraukti grozot stikla kolbu vismaz 30 minūtes, bet vēlams visu nakti. Pēc tam papildināto pārtiku attiecīgi glabā (piemēram, dzesētavā), lai barībā nodrošinātu testējamās vielas stabilitāti līdz tās izmantošanai.

Zivju barības sagatavošana, izmantojot organisku šķīdinātāju

Pienācīgu daudzumu testējamās vielas (ar molmasu vai specifisku radioaktivitāti), ar ko pietiek, lai iegūtu mērķdevu, izšķīdina atbilstošā organiskajā šķīdinātājā (piemēram, cikloheksānā vai acetonā; 10-40 ml, bet vajadzības gadījumā lielākā tilpumā, atkarībā no papildināmās barības daudzuma). Alikvotu vai visu (attiecībā uz pievienoto devu) šo šķīdumu sajauc ar atbilstošu masu zivju barības, ar ko pietiek, lai testā panāktu vēlamo nominālo devas līmeni. Barību/testējamo vielu var sajaukt nerūsošā tērauda jaukšanas bļodā, un svaigi sagatavoto zivju barību uz divām dienām atstāj bļodā laboratorijas skapī (reizēm apmaisot), lai ļautu iztvaikot liekajam šķīdinātājam, vai samaisa rotācijas ietvaicētāja apaļkolbā, nodrošinot nepārtrauktu rotāciju. Lieko šķīdinātāju var "nopūst" ar gaisa strūklu vai slāpekli, ja nepieciešams. Jārūpējas par to, lai nodrošinātu, ka testējamā viela pēc šķīdinātāja novākšanas nekristalizējas. Papildinātā barība jāglabā apstākļos (piemēram, dzesētavā), kas nemaina testējamās vielas stabilitāti barības maisījumā līdz tā izmantošanai.

3. ASIMILĀCIJAS EFEKTIVITĀTES UN BIOMAGNIFIKĀCIJAS KOEFICIENTA APRĒĶINĀŠANA

Lai aprēķinātu asimilācijas efektivitāti, vispirms saskaņā ar 5. papildinājuma 4. iedaļu (izmantojot "secīgo metodi", t. i., standarta lineāro regresiju) jāaplēš kopējā izvadīšanas ātruma konstante, izmantojot izvadīšanas fāzes parauga vidējās koncentrācijas. Barošanas ātruma konstante I un uzņemšanas ilgums t ir zināmie pētījuma parametri. Vidējā mērītā testējamās vielas koncentrācija barībā C_{food} šajā pētījumā ir mērītais mainīgais lielums. Testējamās vielas koncentrācija zivī $C_{0,\text{d}}$ uzņemšanas fāzes beigās parasti tiek iegūta no grafiski attēlota vienādojuma brīvā locekļa ln(koncentrācija) pret izvadīšanas dienu.

Vielas asimilācijas efektivitāti (a, testējamās vielas absorbciju zarnās) aprēķina šādi:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{barībā}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Vienādojums A7.1.]}$$

kur:

$C_{0,d}$ = izvadīšanas fāzes nulles laikā iegūtā koncentrācija zivī (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = kopējā (ar augšanu nekoriģētā) izvadīšanas ātruma konstante (dienā$^{-1}$), kas aprēķināta saskaņā ar 5. papildinājuma 3. iedaļā norādītajiem vienādojumiem;

I = barības uzņemšanas ātruma konstante (g barības g^{-1} zivs dienā$^{-1}$);

$C_{\text{barībā}}$ = koncentrācija barībā (mg kg^{-1} barība);

t = barošanas perioda ilgums (diena).

Tomēr šajā aprēķinā izmantotā barošanas intensitāte I var būt jāpielāgo zivs augšanai, lai sniegtu pareizu asimilācijas efektivitāti a. Testā, kura uzņemšanas fāzē zivis aug ātri (kurā nav veikta barības daudzuma korekcija, lai saglabātu noteikto barošanas intensitāti), iegūtā barošanas intensitāte, uzņemšanas fāzei progresējot, būs zemāka par noteikto, kā rezultātā tiks iegūta augstāka "patiesā" asimilācijas efektivitāte. (Piebilde: tas ir svarīgi attiecībā uz kopējā *BMF* aprēķināšanu, jo I nosacījumi rezultātā atceļ vienādojumu A7.1. un vienādojumu A7.4.). Vidējo barošanas intensitāti I_g, kas koriģēta saskaņā ar augšanas izraisītu atšķaidījumu, var iegūt vairākos veidos, bet vienkāršs un precīzs paņēmiens ir izmantot zināmu augšanas ātruma konstanti (k_g), lai uzņemšanas fāzes laikpunktos aplēstu testa zivju svaru, *t. i.*:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Vienādojums A7.2.]}$$

kur

$W_f(t)$ = vidējais zivs svars uzņemšanas dienā t

$W_{f,0}$ = vidējais zivs svars eksperimenta dienā

Tādā veidā (vismaz) var aplēst vidējo zivs svaru pēdējā ekspozīcijas dienā ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Tā kā barošanas intensitāte bija balstīta uz $W_{f,0}$, rezultātā iegūto barošanas intensitāti katrai uzņemšanas dienai var aprēķināt, izmantojot šīs divas svara vērtības. Ar augšanu koriģēto barošanas intensitāti I_g (g barības g^{-1} zivju dienā$^{-1}$), ko straujas augšanas gadījumos uzņemšanas fāzes laikā var izmantot I vietā, var aprēķināt šādi:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{uzņemšanas fāzes beigas}}} \qquad \text{[Vienādojums A7.3.]}$$

Līdzko ir iegūta asimilācijas efektivitāte, *BMF* var aprēķināt, to sareizinot ar barošanas intensitātes konstanti I (vai I_g, ja to izmanto, lai aprēķinātu α) un produktu sadalot ar kopējo izvadīšanas ātruma konstanti k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Vienādojums A7.4.]}$$

Tādā pašā veidā jāaprēķina arī ar augšanu koriģētais biomagnifikācijas koeficients, izmantojot ar augšanu koriģēto izvadīšanas ātruma konstanti (kas iegūta saskaņā ar 5. papildinājuma 7. iedaļu). Vēlreiz — ja I_g tika izmantots, lai aprēķinātu α, tas būtu arī jāizmanto šeit, nevis I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Vienādojums A7.5.]}$$

kur:

α = asimilācijas efektivitāte (testējamās vielas absorbcija zarnās);

k_2 = kopējā (ar augšanu nekoriģētā) izvadīšanas ātruma konstante (dienā$^{-1}$), kas aprēķināta saskaņā ar 5. papildinājuma 3. iedaļā norādītajiem vienādojumiem;

▼M7

k_{2g} = ar augšanu koriģētā izvadīšanas ātruma konstante (dienā$^{-1}$);

I = barības uzņemšanas ātruma konstante (g barības g^{-1} zivs dienā$^{-1}$);

Ar augšanu koriģētu pussabrukšanas periodu ($t_{1/2}$) aprēķina šādi.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Vienādojums A7.6.]}$$

Vielas asimilācijas efektivitāti barībā var aprēķināt, ja uzņemšanas fāzes lineārajā posmā (starp 1. un 3. dienu) ir konstatētas audu atliekas. Tādā gadījumā vielas asimilācijas efektivitāti (α) var noteikt šādi:

$$\alpha = \frac{C_{zivīm}(t)}{I \times C_{barībai} \times t} \qquad \text{[Vienādojums A7.7.]}$$

Kur

$C_{\text{zivīm}}$ *(t)* = testējamās vielas koncentrācija zivs organismā laikā t (mg kg^{-1} slapjsvara).

4. KOREKCIJA AR LIPĪDIEM

Ja visos paraugošanas intervālos lipīdsaturs mērīts tai pašai zivij, kurai izdarīta ķīmiskā analīze, lai iegūtu $C_{0,d}$ un $k_{2,}$ individuālās koncentrācijas jākoriģē uz lipīdu bāzes un ar grafiski attēlotu ln (ar lipīdiem koriģēta koncentrācija) attiecībā pret izvadīšanu (dienu). Pēc tam var aprēķināt asimilācijas efektivitāti (vienādojums A7.1.), pamatojoties uz lipīdu bāzi, izmantojot $C_{\text{barībai}}$ uz lipīdu bāzi (*t. i.*, $C_{\text{barībai}}$ sareizina ar vidējo barības lipīdu frakciju). Ar turpmāku aprēķinu, izmantojot vienādojumu A7.4. un vienādojumu A7.5., tiešā veidā iegūst ar lipīdiem koriģētu (un atbilstīgi augšanas izraisītam atšķaidījumam koriģētu) *BMF*.

Pretējā gadījumā vidējo lipīdu frakciju (masas) zivs organismā un barībā iegūst gan no apstrādgrupas, gan kontrolgrupām (barībai un kontrolgrupas zivīm — parasti no datiem, kas mērīti ekspozīcijas sākumā un beigās; apstrādgrupas zivīm — parasti no datiem, kas mērīti tikai ekspozīcijas beigās). Dažos pētījumos zivju lipīdsaturs var ievērojami palielināties; tādos gadījumos ir pienācīgi izmantot testa zivju lipīdu vidējo koncentrāciju, kas aprēķināta no ekspozīcijas beigās un izvadīšanas beigās izmērītajām vērtībām. Parasti dati no apstrādgrupas jāizmanto vienīgi tam, lai iegūtu abas lipīdu frakcijas.

Lipīdu korekcijas koeficientu (L_c) aprēķina šādi:

$$L_C = \frac{L_{zivī}}{L_{barībā}} \qquad \text{[Vienādojums A7.8.]}$$

kur $L_{\text{zivī}}$ un $L_{\text{barībā}}$ ir attiecīgi vidējās lipīdu frakcijas zivī un barībā.

Lipīdu korekcijas koeficientu izmanto, lai aprēķinātu ar lipīdiem koriģētu biomagnifikācijas koeficientu (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Vienādojums A7.9.]}$$

5. ATŠĶIRĪBU IZVĒRTĒJUMS STARP MĒRĪTO NULLES LAIKA KONCENTRĀCIJU ($C_{0,\text{M}}$) UN IEGŪTO NULLES LAIKA KONCENTRĀCIJU ($C_{0,\text{D}}$)

Mērītā nulles laika koncentrācija ($C_{0,\text{m}}$) jāsalīdzina ar iegūto nulles laika koncentrāciju ($C_{0,\text{d}}$). Ja tās ir ļoti līdzīgas, tiek pamatots izvadīšanas parametru iegūšanai izmantotais pirmās pakāpes modelis.

▼M7

Dažos pētījumos var būt ievērojama atšķirība starp iegūto nulles laika vērtību $C_{0,d}$ un mērīto nulles laika vidējo koncentrāciju $C_{0,m}$ (sk. šīs testēšanas metodes 159. punkta pēdējo ievilkumu). Ja $C_{0,d}$ ir daudz mazāks par $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), šī atšķirība var norādīt, ka zarnās atrodas nesagremota papildinātā barība. Ja uzņemšanas fāzes beigās ir ņemti un glabāti papildu (veselas zivs) paraugi, to var pārbaudīt eksperimentā, atsevišķi analizējot izgrieztās zarnas. Pretējā gadījumā, ja izvadīšanas fāzes lineārajai regresijai piemērotais statistiski derīgais izlēcošās vērtības tests norāda, ka pirmais izvadīšanas parauga punkts ir kļūdaini palielināts, var būt lietderīgi veikt lineāro regresiju, lai iegūtu k_2, bet izlaižot pirmo koncentrācijas izvadīšanas punktu. Tādos gadījumos, ja neskaidrība lineārajā regresijā tiek ievērojami samazināta un ir skaidrs, ka tika ievērota apmēram pirmās pakāpes izvadīšanas kinētika, asimilācijas efektivitātes aprēķināšanā var būt atbilstoši izmantot rezultātā iegūtās $C_{0,d}$ un k_2 vērtības. Tas pilnībā jāpamato pārskatā. Vēl ir iespējams, ka izvadīšanas fāzē darbojās kinētika, kas nav pirmās pakāpes kinētika. Ja tas ir iespējams (*t. i.*, novērojams, ka naturāllogaritma transformētie dati salīdzinājumā ar taisnas līnijas lineārās regresijas grafiku drīzāk atbilst līknei), k_2 un $C_{0,d}$ aprēķini, visticamāk, nebūs derīgi un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

Ja $C_{0,d}$ ir daudz lielāks par izmērīto vērtību ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), tas var liecināt par sekojošo: viela ļoti ātri tika izvadīta (*t. i.*, paraugošanas punkti izvadīšanas fāzē ļoti ātri sasniedza analītiskās metodes kvantitatīvās noteikšanas robežu; sal. tālāk ar 6. iedaļu); bija novirze no pirmās pakāpes izvadīšanas kinētikas; lineārajai regresijai, ar ko iegūst k_2 un $C_{0,d}$, piemīt trūkumi; vai pētījumā dažos paraugošanas punktos radās problēma ar mērītajām koncentrācijām. Tādos gadījumos rūpīgi jāizpēta lineārās regresijas grafiks attiecībā uz pierādījumiem par paraugiem, kuri atrodas uz kvantitatīvās noteikšanas robežas vai tuvu tai, attiecībā uz izlecošajām vērtībām un acīmredzamu izliekumu (kas liecina par kinētiku, kas nav pirmās pakāpes kinētika), un tas jānorāda pārskatā. Jāapraksta un jāpamato visi nākamie vērtību uzlabošanai veiktie lineārās regresijas atkārtotie izvērtējumi. Ja tiek novērota būtiska novirze no pirmās pakāpes kinētikas, k_2 un $C_{0,d}$ aprēķini, visticamāk, nebūs derīgi, un jālūdz biostatistikas speciālista padoms.

6. NORĀDĪJUMI ATTIECĪBĀ UZ ĻOTI STRAUJI IZVADĪTĀM TESTĒJAMĀM VIELĀM

Kā apsvērts testēšanas metodes 129. punktā, dažas vielas var tikt izvadītas tik ātri, ka nav iespējams iegūt ticamu nulles laika koncentrāciju $C_{0,d}$ un k_2, jo paraugos ļoti agrīnā izvadīšanas fāzē (*t. i.*, no otrās izvadīšanas parauga un turpmāk) viela vairs netiek mērīta (kvantitatīvās noteikšanas robežās ziņotas koncentrācijas). Šāda situācija tika novērota, veicot starplaboratoriju salīdzināšanu šīs metodes pamatošanai attiecībā uz benzo[a]pirēnu, un tā tika dokumentēta metodes validācijas pārskatā. Tādos gadījumos nav iespējams veikt ticamu lineāro regresiju un, visticamāk, tiks sniegta nereāli augsta $C_{0,d}$ aplēse, rezultātā radot acīmredzamu asimilācijas efektivitāti, kas ir daudz lielāka par 1. Šādos gadījumos ir iespējams aprēķināt konservatīvu k_2 aplēsi un "augstāko pieļaujamo" *BMF*.

Izmantojot šos izvadīšanas fāzes datu punktus, kuros tika mērīta koncentrācija, līdz pat un ietverot pirmo "nedetektēto" koncentrāciju (uz kvantitatīvās noteikšanas robežas noteiktā koncentrācija), lineārā regresijā (izmantojot naturāllogaritma transformētus koncentrācijas datus attiecībā pret laiku) tiks iegūta k_2 aplēse. Šādos gadījumos tas varētu iesaistīt vienīgi divus datu punktus (piemēram, izvadīšanas fāzes 1. un 2. paraugošanas dienā), un pēc

▼M7

tam k_2 var aprēķināt, izmantojot 5. papildinājumā norādīto vienādojumu A5.22. Šo k_2 aplēsi var izmantot, lai aplēstu asimilācijas efektivitāti saskaņā ar vienādojumu A7.1., vērtību $C_{0,d}$ vienādojumā aizstājot ar izmērīto nulles laika koncentrāciju ($C_{0,m}$) gadījumos, kad aplēstais $C_{0,d}$ ir viennozīmīgi daudz lielāks par to, ko varētu sasniegt šajā testā. Ja $C_{0,m}$ nebija izmērāms, zivs audiem jāizmanto noteikšanas robeža. Ja dažos gadījumos iegūtā vērtība ir $\alpha > 1$, pieņem, ka asimilācijas efektivitāte "sliktākajā gadījumā" ir 1.

Pēc tam var aplēst maksimālo BMF_K, izmantojot vienādojumu A7.4., un tas jānorāda kā "daudz mazāks par" (<<) vērtību. Piemēram, pētījumā, kas tiek veikts ar 3 % barošanas intensitāti un kur izvadīšanas pussabrukšanas periods nepārsniedz 3 dienas, un "sliktākajā gadījumā" α ir 1, BMF_K, visticamāk, būs zemāks par apmēram 0,13. Ņemot vērā šīs aplēses nolūku un faktu, ka vērtības būs konservatīvas, tās jākoriģē ar augšanas izraisītu atšķaidījumu vai zivs un barības lipīdsaturu.

▼M7

8. papildinājums

PIEEJAS ORIENTĒJOŠU BCF APLĒŠANAI NO DATIEM, KAS IEGŪTI BARĪBEKSPOZĪCIJAS PĒTĪJUMĀ

Ar barību saistītā metode šajā testēšanas metodē iekļauta attiecībā uz tādu vielu bioakumulācijas testēšanu, kuras praksē nav iespējams testēt, izmantojot ūdensekspozīcijas metodi. Ar ūdensekspozīcijas metodi iegūstams biokoncentrēšanās koeficients, savukārt ar barības metodi tieši iegūstama informācija par barošanās biomagnifikācijas potenciālu. Daudzos ķimikālijas drošuma režīmos jāiekļauj informācija par ūdenisko bioloģisko koncentrēšanos (piemēram, riska novērtējumā un klasificēšanas vispārēji saskaņotajā sistēmā). Tādēļ ir vajadzība, izmantojot ar barību saistītajā pētījumā iegūtos datus, aplēst tādu biokoncentrēšanās koeficientu, kas ir salīdzināms ar koeficientu, ko iegūtu testos, kuri veikti saskaņā ar ūdensekspozīcijas metodi ([1]). Šajā iedaļā aplūkots, ar kādām pieejām to var panākt, vienlaicīgi apzinoties šīm aplēsēm raksturīgos trūkumus.

Uzturpētījumā mēra izvadīšanu, lai iegūtu izvadīšanas ātruma konstanti k_2. Ja no datiem, kas pieejami par situāciju, kur zivs testējamai vielai eksponēta ar ūdeni, iespējams aplēst uzņemšanas ātruma konstanti, ir iespējams aplēst kinētisko *BCF*.

Aplēse, kurā noskaidro uzņemšanas ātruma konstanti gadījumos, kad organisms testējamajai vielai tiek eksponēts ūdens ceļā, balstās uz daudziem pieņēmumiem, kas visi vairo ar aplēsi saistīto nenoteiktību. Turklāt šādā *BCF* aplēšanas pieejā tiek pieņemts, ka kopējais izvadīšanas ātrums (tostarp tādi sekmējoši faktori kā sadalījums organismā un atsevišķi izvadīšanas procesi) ir atkarīgs no tā, ar kādu ekspozīcijas paņēmienu panākta testējamas vielas uzņemšana organismā.

Aplēšanas pieejai raksturīgos galvenos pieņēmumus var apkopot, kā norādīts turpmāk.

Izvadīšana, kas notiek pēc uzņemšanas caur barību, ir tāda pati kā izvadīšana pēc ūdensekspozīcijas attiecīgajai vielai.

Uzņemšana no ūdens norit saskaņā ar pirmās pakāpes kinētiku.

Atkarībā no uzņemšanas aplēšanai izmantotās metodes:

— uzņemšana var korelēt ar zivs svaru vien,

— uzņemšana var korelēt ar vielas oktanola–ūdens sadalījuma koeficientu vien,

— uzņemšana var korelēt, apvienojot zivs svaru un vielas oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu,

— faktoriem, kas var praktiski ietekmēt uzņemšanu ūdensekspozīcijas pētījumā, piemēram, vielas bioloģiskajai pieejamībai, adsorbcijai uz aprīkojuma, molekulārajam izmēram utt. ietekme ir maza

— un svarīgi, lai

uzņemšanas aplēšanas metodes izstrādē izmantotā datu bāze (“apmācības kopa”) ir attiecīgajai vielai pienācīgi reprezentatīva.

Pieejamajā literatūrā vairākās publikācijās norādīti vienādojumi, kas uzņemšanu zivī no ūdens caur žaunām izsaka pēc oktanola–ūdens sadalījuma koeficienta, zivs svara (1) (2) (3) (4), tilpuma un/vai lipīdsatura, izsūkšanās/difūzijas caur membrānu (5) (6), zivs ventilācijas tilpuma (7) un uz gaistamības/masas bilances

([1]) Dabā ceļš, kurš ūdensvidē radīs vislielāko eksponētību stipri hidrofobām vielām, visticamāk, ir uzņemšana ar barību, līdz ar to *BCF* aplēse ne vienmēr atspoguļo tādas vielas bioakumulācijas potenciālu.

▼M7

pieejas (8) (9) (10). Šajā sakarā tādas metodes detalizēti novērtē *Crookes & Brooke* (11). *Barber* (12) savā publikācijā modelē bioakumulāciju, kurā uzņemšana notiek ar barību, un tā ir lietderīga arī šajā sakarībā, jo ietver informāciju no uzņemšanas ātruma modeļiem, kuros uzņemšana notiek caur žaunām. Šim aspektam bija veltīta arī iedaļa 2004. gada ar barību saistītā protokola pamatojuma dokumentā (13).

Vairums šo modeļu, liekas, ir izstrādāti, izmantojot ierobežotas datu bāzes. Liekas, ka gadījumos, kad pieejama informācija par modeļa izveidē izmantoto datu bāzi, bieži vien izmantotas struktūras vai klases ziņā līdzīgas vielas (funkcionalitātes ziņā, piemēram, hlororganiski savienojumi). Tas palielina nenoteiktību, kas saistīta ar modeļa izmantošanu, lai prognozētu uzņemšanas ātruma konstanti cita veida vielai, papildus testam specifiskiem apsvērumiem, piemēram, sugai, temperatūrai utt.

Pieejamo paņēmienu pārskatā (11) tiek uzsvērts, ka neviena atsevišķa metode nav "pareizāka" par citām. Tādēļ modeļa izraudzīšanās skaidri jāpamato. Ja ir pieejamas vairākas metodes, kuru izmantošana ir pamatojama, var būt vēlami sniegt vairākas k_1 (un līdz ar to — *BCF*) aplēses vai k_1 vērtību (un *BCF*) diapazonus, kas iegūti ar vairākām uzņemšanas aplēšanas metodēm. Tomēr, ņemot vērā atšķirības starp modeļu veidiem un to izstrādē izmantotajām datu kopām, ņemt vidējo vērtību no dažādos veidos iegūtām aplēsēm nebūtu lietderīgi.

Daži pētnieki ir postulējuši, ka, lai šo aplēsi pieskaņotu ūdensekspozīcijas pētījumu rezultātiem, šāda veida *BCF* aplēsēm jākoriģē biopieejamība tā, lai būtu ņemtu vērā vielas adsorbēšanās uz izšķīdušā organiskā oglekļa (*DOC*) ūdensekspozīcijas apstākļos (piemēram, (13) (14)). Taču šī korekcija var nebūt piemērota, ņemot vērā, cik zems *DOC* līmenis nepieciešams, lai ūdensekspozīcijas pētījumā aplēstu "sliktāko gadījumu" (t. i., bioloģiski pieejamas vielas attiecību pret šķīdumā mērīto vielu). Stipri hidrofobām vielām uzņemšanu caur žaunām var ierobežot pasīvās difūzijas ātrums pie žaunas virsmas; šajā gadījumā ir iespējams, ka korekcija varētu ņemt vērā šo efektu, nevis to, kam tā paredzēta.

Ja vielu testē saskaņā ar šeit aprakstīto barības pētījumu (*t. i.* log K_{OW}, zivs svars), ieteicams koncentrēties uz metodēm, kurām nepieciešama tāda informācija, kurai vajadzīgie dati attiecībā uz testētajām vielām jau ir pieejami. Var izmantot citas metodes, kurām nepieciešama sarežģītāka informācija, bet tad testā var būt jāveic papildu mērījumi vai var būt nepieciešamas sīkas zināšanas par testējamo vielu vai zivs sugu, kas var nebūt plaši pieejamas. Turklāt modeļa izraudzīšanos var ietekmēt validācijas līmenis un pielietojamības joma (pārskatu par dažādām metodēm un to salīdzinājumu sk. (11)).

Jāpatur prātā, ka iegūtajai k_1 aplēsei un *BCF* aplēsei piemīt liela nenoteiktība un ka, lai iegūtu vispārēju priekšstatu par vielas bioakumulācijas potenciālu, tās kopā ar iegūtajiem *BMF* un vielas parametriem (piemēram, molekulāro izmēru) var būt nepieciešams izsvērt saskaņā ar pierādījumu nozīmīguma pieeju. Šo parametru interpretēšana un izmantošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and 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., Part P. and 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. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 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, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and 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. and 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. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and 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. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental 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) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. ZIVJU MAZUĻU AUGŠANAS TESTS

1. METODE

Šī augšanas toksicitātes testa metode ir ESAO TG 215 (2000) kopija.

1.1. IEVADS

Šis tests ir paredzēts, lai novērtētu ilgstošas ķimikāliju iedarbības ietekmi uz zivju mazuļu augšanu. Tas pamatojas uz metodi, kas izveidota un kam izdarīts gredzena tests (1) (2) Eiropas Savienībā un kas paredzēta ķimikāliju ietekmes novērtēšanai uz varavīksnes foreļu (*Oncorynchus mykiss*) mazuļu augšanu caurplūdes apstākļos. Var izmantot citas labi dokumentētas sugas. Piemēram, pieredze ir iegūta zebras zivs (*Danio rerio*) ([1]) (3) (4) un rīsa zivs (medaka, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7) augšanas testos.

Skatīt arī vispārīgā ievada C daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Mazākās novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*): testa vielas mazākā testētā koncentrācija, pie kuras ir novērots, ka vielai ir nozīmīga ietekme (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontroli. Tomēr pie visām testa koncentrācijām, kas lielākas par *LOEC*, ir jābūt negatīvai ietekmei, kas ir vienāda ar vai lielāka par negatīvo ietekmi, kas novērota pie *LOEC*.

Nenovērojamas ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija tieši zem *LOEC*.

EC_x: šajā testa metodē tā ir testa vielas koncentrācija, kas izraisa x % pārmaiņas zivju augšanas ātrumā, salīdzinot ar kontroli.

Noslogojums: zivju mitrais svars ūdens tilpuma vienībā.

Apdzīvotības blīvums: zivju skaits ūdens tilpuma vienībā.

Atsevišķas zivs īpatnējais augšanas ātrums: izsaka viena īpatņa augšanas ātrumu, pamatojoties uz tā sākotnējo svaru.

Vidējais īpatnējais augšanas ātrums tvertnē: izsaka tvertnes īpatņu kopskaita vidējo augšanas ātrumu vienā koncentrācijā.

Pseidoīpatnējais augšanas ātrums: izsaka individuālo augšanas ātrumu salīdzinājumā ar tvertnes īpatņu kopskaita vidējo sākuma svaru.

([1]) 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 comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231–236.

▼B

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Zivju mazuļus eksponenciālajā augšanas fāzē pēc nosvēršanas ievieto testa tvertnēs un pakļauj ūdenī izšķīdinātas testa vielas iedarbībai subletālu koncentrāciju diapazonā, vēlams, caurplūdes apstākļos vai, ja tas nav iespējams, piemērotos pusstatiskos (statiskos ar atjaunošanu) apstākļos. Testa ilgums ir 28 dienas. Zivis baro katru dienu. Barības deva pamatojas uz zivju sākotnējiem svariem, un to var pārrēķināt pēc 14 dienām. Testa beigās zivis vēlreiz nosver. Ietekmi uz augšanas ātrumu analizē, izmantojot regresijas modeli, lai novērtētu koncentrāciju, kas izraisa augšanas ātruma pārmaiņu par x %, t. i., EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{20}, vai EC_{30}). Alternatīvi datus var salīdzināt ar kontroles lielumiem, lai noteiktu mazākās novērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un no tās – nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*).

1.4. INFORMĀCIJA PAR TESTA VIELU

Būtu jābūt pieejamiem akūtās toksicitātes testa (skatīt C.1. testa metodi) rezultātiem, kas, vēlams, iegūti ar šim testam izraudzīto sugu. Tas nozīmē, ka testa vielas šķīdība ūdenī un tvaika spiediens ir zināms un ka vielas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama droša analītiska metode ar zināmu precizitāti un atklāšanas robežu.

Noderīga informācija iekļauj struktūras formulu, vielas tīrības pakāpi, stabilitāti ūdenī un gaismā, pK_a, P_{ow} un vieglas bionoārdīšanās testa rezultātus (skatīt testa C.4. metodi).

1.5. TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— kontroles grupā kopējā dzīvnieku mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 %,

— kontroles grupā zivju vidējā svara palielinājumam jābūt pietiekami lielam, lai varētu noteikt vismazākās augšanas ātruma pārmaiņas, ko uzskata par nozīmīgām. Gredzena tests (2) ir parādījis, ka varavīksnes forelei kontroles grupā vidējam svaram 28 dienās ir jāpalielinās vismaz uz pusi (t. i., par 50 %); piemēram, sākotnējais svars: 1 g uz zivi (= 100 %), beigu svars pēc 28 dienām: = 1,5 g uz zivi (≥ 150 %),

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt vismaz 60 % no piesātināšanas ar gaisu lieluma,

— ūdens temperatūra jebkurā testa laika mirklī nedrīkst starp testa tvertnēm atšķirties vairāk par ± 1 °C, un tā būtu jāuztur 2 °C diapazonā temperatūru intervālos, kas norādīti testa sugām (1. papildinājums).

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Iekārta**

Parastais laboratorijas aprīkojums un jo īpaši:

— skābekļa mērīšanas iekārtas un pHmetri,

▼B

— aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai,

— atbilstīga aparatūra temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktai uzraudzībai,

— ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā pret ieteicamo noslogojumu un apdzīvotības blīvumu (skatīt 1.8.5. punktu un 1. papildinājumu),

— pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti ± 0,5 %).

1.6.2. **Ūdens**

Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu. Tā kvalitātei testa laika posmā jābūt nemainīgai. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā. Cietība ir ieteicama lielāka par 140 mg/l (rēķinot uz $CaCO_3$). Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, veidojot kompleksus ar testa vielu), noteiktos intervālos jāņem paraugi analīzei. Smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca, Mg, Na, K, Cl un SO_4), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendētu cietu vielu mērījumus, piemēram, jāveic reizi trijos mēnešos, ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga. Ja ir parādīts, ka ūdens kvalitāte ir nemainīga vismaz viena gada laikā, mērījumi var būt retāki un intervāli var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos). Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir uzskaitīti 2. papildinājumā.

1.6.3. **Testa šķīdumi**

Izraudzītās koncentrācijas testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejas šķīdumu.

Izejas šķīdumu vēlams pagatavot, vienkārši maisot vai kratot testa vielu ar atšķaidīšanas ūdeni, izmantojot mehāniskus līdzekļus (piemēram, kratītāju vai ultraskaņu). Piemērota koncentrēta izejas šķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas).

Dažos gadījumos, lai iegūtu piemērotas koncentrācijas izejas šķīdumu, var būt jālieto šķīdinātāji vai disperģējošas vielas (šķīdību veicinošas vielas). Piemērotu šķīdinātāju piemēri ir acetons, etilspirts, metilspirts, dimetilsulfoksīds, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Piemērotu disperģējošu vielu piemēri ir *Cremophor* RH40, *Tween* 80, 0,01 % metilceluloze un HCO-40. Ir jābūt uzmanīgam, lietojot viegli bionoārdāmas vielas (piemēram, acetonu) un/vai viegli gaistošus savienojumus, jo tie var radīt problēmas ar baktēriju augšanu caurplūdes testos. Ja lieto šķīdību veicinošu vielu, tā nedrīkst jūtami ietekmēt zivju augšanu un redzami negatīvi ietekmēt mazuļus, ko var novērot kontroles mēģinājumā, kuru izdara ar šķīdinātāju vien.

▼B

Caurplūdes testos ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti piegādā un atšķaida testa vielas izejas šķīdumu (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālais atšķaidītājs, piesātināšanas sistēma), lai testa tvertnēm piegādātu virkni koncentrāciju. Izejas šķīdumu un atšķaidīšanas ūdens plūsmas ātrumi testa laikā jāpārbauda noteiktos intervālos, vēlams, reizi dienā, un tie testa laikā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Gredzena testā (2) ir parādīts, ka testa laikā varavīksnes forelēm ūdens aizvadīšana 6 litri uz zivs gramu dienā ir pieņemams daudzums (skatīt 1.8.2.2. punktu).

Pusstatiskajiem (atjaunošanas) testiem vides atjaunošanas biežums ir atkarīgs no testa vielas stabilitātes, bet ir ieteicams ūdeni atjaunot katru dienu. Ja no iepriekšējiem stabilitātes testiem (skatīt 1.4. punktu) ir zināms, ka testa vielas koncentrācija nav stabila (t. i., ārpus 80–120 % diapazona no nominālās koncentrācijas vai mazāka par 80 % no izmērītās sākotnējās koncentrācijas) atjaunošanas laika posmā, tad jāapsver caurplūdes testa izmantošana.

1.6.4. **Sugu izvēle**

Šim testam ieteicama suga ir varavīksnes forele (*Oncorhynchus mykiss*), jo pieredzes lielākā daļa ir iegūta gredzena testā ar šo sugu (1) (2). Tomēr var izmantot citas labi dokumentētas sugas, bet var būt vajadzīga testa procedūras pielāgošana, lai nodrošinātu piemērotus testa apstākļus. Piemēram, pieredze ir pieejama arī ar zebras zivi (*Danio rerio*) (3) (4) un rīsu zivi (medaka, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Tādā gadījumā ir jāprotokolē sugas izvēles pamatojums un eksperimenta metode.

1.6.5. **Zivju turēšana**

Testa zivis izvēlas no viena bara populācijas, vēlams no viena un tā paša nārsta, kas vismaz divas nedēļas pirms testa ir turēts ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos, kuri līdzīgi testa apstākļiem. Tās jābaro ar barības devu, mazākais, 2 % no ķermeņa svara dienā un, vēlams, 4 % no ķermeņa svara dienā visā turēšanas laika posmā un testa laikā.

Pēc 48 stundu ievietošanas laika posma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:

— mirstība septiņās dienās ir lielāka par 10 % no populācijas: izbrāķē visu partiju,

— mirstība starp 5 % un 10 % no populācijas: aklimatizācija septiņu papildu dienu laikā; ja mirstība otru septiņu dienu laikā ir lielāka par 5 %, izbrāķē visu partiju,

— mirstība septiņās dienās ir mazāka par 5 % no populācijas: partiju pieņem.

Zivis nevajadzētu ārstēt no slimībām divu nedēļu laikā pirms testa vai testa laikā.

▼B

1.7. TESTA PLĀNS

Testa plāns attiecas uz testa koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, tvertņu skaitu katram koncentrācijas līmenim un zivju skaitu tvertnē. Ideālā gadījumā testa plāns būtu jāizvēlas, ņemot vērā:

— pētījuma mērķi,

— statistiskās analīzes metodi, ko izmantos,

— eksperimenta resursu pieejamību un izmaksas.

Mērķu izklāstā, ja iespējams, būtu jākonkretizē statistiskā selektivitāte, kas vajadzīga, lai noteiktu attiecīgo atšķirības lielumu (piemēram, augšanas ātruma atšķirību) vai, alternatīvi, precizitāte, ar kuru ir jānovērtē EC_x (piemēram, x = 10, 20, vai 30 un, vēlams, ne mazāk par 10). Bez tā nav iespējams dot stingru priekšrakstu par pētījuma lielumu.

Ir svarīgi saprast, ka plāns, kas ir optimāls (vislabākā veidā izmanto resursus) lietošanai ar vienu statistiskās analīzes metodi, nav katrā ziņā optimāls ar citu metodi. Ieteicamais plāns *LOEC/NOEC* novērtēšanai tātad nav tas pats, kas ieteicams regresijas analīzei.

Lielākajā daļā gadījumu regresijas analīze ir jāuzskata par labāku nekā dispersiju analīze Stefena un Rodžersa apspriesto iemeslu dēļ (8). Tomēr, ja nav atrasts piemērots regresijas modelis ($r^2 < 0,9$), būtu jāizmanto *NOEC/LOEC*.

1.7.1. **Regresijas analīzes plāns**

Ar regresiju analizējama testa plānā ir svarīgi ņemt vērā:

— testā izmantotajām koncentrācijām noteikti ir jāaptver efektīvā koncentrācija (piemēram, $EC_{10,20,30}$) un koncentrāciju diapazons, kurā ir interese par testa vielas ietekmi. Precizitāte, ar kuru var novērtēt efektīvās koncentrācijas, ir vislielākā, ja efektīvā koncentrācija ir testēto koncentrāciju diapazona vidū. Izraugoties piemērotas testa koncentrācijas, noderīgs var būt diapazona atrašanas priekšmēģinājums.

— Lai nodrošinātu apmierinošu statistisko modelēšanu, testā būtu jāiekļauj vismaz viena kontroles tvertne un piecas papildu tvertnes ar dažādām koncentrācijām. Attiecīgā gadījumā, ja lieto šķīdību veicinošu vielu, papildus testa rindai būtu jāizdara kontroles mēģinājums, kas satur šķīdību veicinošo vielu augstākajā testētajā koncentrācijā (skatīt 1.8.3. un 1.8.4. punktu).

— Var izmantot piemērotu ģeometrisko rindu vai logaritmisko rindu (9) (skatīt 3. papildinājumu). Priekšroka ir jādod testa koncentrāciju logaritmiskiem intervāliem.

▼B

— Ja ir pieejamas vairāk nekā sešas tvertnes, papildu tvertnes būtu jāizmanto paralēliem mēģinājumiem vai arī jāizdala pa koncentrāciju diapazonu, lai nodrošinātu mazākus intervālus starp līmeņiem. Abi šie pasākumi ir vienlīdz vēlami.

1.7.2. ***NOEC/LOEC* novērtēšanas plāns, izmantojot dispersiju analīzi (*ANOVA*)**

Vēlams, lai katrai koncentrācijai būtu paralēlo mēģinājumu tvertnes un statistisko analīzi izdarītu atsevišķām tvertnēm (10). Bez paralēlo mēģinājumu tvertnēm nav iespējams ņemt vērā mainīgumu starp tvertnēm, ārpus tā, kas pastāv starp atsevišķām zivīm. Tomēr pieredze ir parādījusi (11), ka aplūkotajā gadījumā mainīgums starp tvertnēm ir ļoti mazs, salīdzinot ar mainīgumu tvertnē (t. i., starp zivīm). Tādēļ relatīvi pieņemama alternatīva ir izdarīt statistisko analīzi atsevišķu zivju līmenī.

Parasti izmanto vismaz piecas testa koncentrācijas ģeometriskā rindā ar koeficientu, kas, vēlams, nav lielāks par 3,2.

Parasti, ja testus izdara ar paralēlo mēģinājumu tvertnēm, paralēlo mēģinājumu kontroles tvertņu skaitam un tātad arī zivju skaitam būtu jābūt divreiz lielākam par skaitu katrā testa koncentrācijā, kurās zivju skaitam vienmēr būtu jābūt vienādam (12) (13) (14). Pretēji, ja nav paralēlo mēģinājumu tvertņu, zivju skaitam kontroles grupā būtu jābūt tādam pašam kā zivju skaitam katrā testa koncentrācijā.

Ja *ANOVA* pamatojas uz tvertnēm, nevis uz atsevišķām zivīm (kam būtu vajadzīgs individuāli marķēt zivis vai izmantot "pseidoīpatnējos" augšanas ātrumus (skatīt 2.1.2. punktu)), ir vajadzīgas pietiekami daudzas paralēlo mēģinājumu tvertnes, lai varētu noteikt standarta novirzes "tvertnēm ar vienu koncentrāciju". Tas nozīmē, ka kļūdas brīvības pakāpēm dispersiju analīzē būtu jābūt vismaz 5 (10). Ja paralēlos mēģinājumus izdara tikai kontroles mēģinājumiem, pastāv risks, ka kļūdas mainīgums būs neobjektīvs, jo tas var palielināties ar attiecīgā augšanas ātruma vidējo lielumu. Tā kā, palielinoties koncentrācijai, augšanas ātrums, sagaidāms, samazināsies, radīsies tendence mainīgumu novērtēt par augstu.

1.8. PROCEDŪRA

1.8.1. **Testa zivju izvēle un svēršana**

Ir svarīgi testa sākumā līdz minimumam samazināt zivju svara atšķirības. Piemērots lielumu diapazons dažādām sugām, kas ir ieteicamas izmantošanai šajā testā, ir norādīts 1. papildinājumā. Visai testā izmantotajai zivju partijai atsevišķo eksemplāru svaru diapazonam ideālā gadījumā būtu jābūt ± 10 % no aritmētiskā vidējā svara, un katrā ziņā tam nevajadzētu pārsniegt 25 %. Ir ieteicams pirms testa nosvērt zivju kopējā parauga daļu, lai novērtētu vidējo svaru.

▼B

Pirms testa sākuma bara populāciju 24 stundas nedrīkstētu barot. Pēc tam zivis jāizvēlas pēc nejaušās izvēles. Lietojot vispārējas anestēzijas līdzekli (piemēram, 100 mg/l trikaīna metānsulfonāta (MS 222) ūdens šķīdumu, kas neitralizēts, pievienojot divas daļas nātrija bikarbonāta uz vienu daļu MS 222), zivis būtu atsevišķi mitras (nosusinātas) jānosver ar 1. papildinājumā norādīto precizitāti. Tās zivis, kuru svars ir paredzētajā intervālā, būtu jāpatur un pēc nejaušās izvēles jāizvieto pa testa traukiem. Kopējais zivju mitrais svars katrā testa traukā būtu jāprotokolē. Anestēzijas līdzekļu lietošana, tāpat kā rīkošanās ar zivīm (iekļaujot susināšanu un svēršanu) var zivju mazuļiem radīt stresu un savainojumus, jo īpaši maza lieluma sugām. Tādēļ ar zivju mazuļiem ir jārīkojas ar vislielāko rūpību, lai testa dzīvniekiem neradītu stresu un tos neievainotu.

Zivis vēlreiz nosver testa 28. dienā (skatīt 1.8.6. punktu). Tomēr, ja uzskata par vajadzīgu pārrēķināt barības devu, zivis var nosvērt vēlreiz testa 14. dienā (skatīt 1.8.2.3. punktu). Lai noteiktu zivju lieluma pārmaiņas, uz kurām pamatojoties var pielāgot barības devas, var izmantot citu metodi, piemēram, fotogrāfisko metodi.

1.8.2. **Iedarbības apstākļi**

1.8.2.1. *Ilgums*

Testa ilgums ir ≥ 28 dienas.

1.8.2.2. *Noslogojums un apdzīvotības blīvums*

Ir svarīgi, lai noslogojums un apdzīvotības blīvums būtu piemērots izmantojamai testa sugai (skatīt 1. papildinājumu). Ja apdzīvotības blīvums ir pārāk liels, tad rodas pārapdzīvotības stress, kas izraisa augšanas ātruma samazinājumu un, iespējams, slimību. Ja tas ir pārāk mazs, tas var ierosināt tādu teritoriālu uzvedību, kas arī var ietekmēt augšanu. Katrā ziņā noslogojumam jābūt pietiekami mazam, lai bez aerācijas varētu uzturēt izšķīdušā skābekļa koncentrāciju vismaz 60 % no piesātinājuma lieluma. Gredzena testā (2) ir parādīts, ka varavīksnes forelēm ir pieņemams noslogojums 16 foreles ar svaru 3–5 g 40 litru tilpumā. Ir ieteicams testa laikā nomainīt 6 litrus ūdens uz gramu zivs dienā.

1.8.2.3. *Barošana*

Zivis jābaro ar piemērotu barību (1. papildinājums) pietiekamā daudzumā, lai izraisītu pieņemamu augšanas ātrumu. Jāpievērš vērība, lai izvairītos no mikrobu augšanas un ūdens duļķainības. Varavīksnes forelēm barības daudzums 4 % no ķermeņa svara dienā varētu atbilst šiem nosacījumiem (2) (15) (16) (17). Dienas devu var sadalīt divās vienādās daļās un dienā dot zivīm divās barošanas reizēs, ko atdala vismaz piecas stundas. Deva pamatojas uz zivju sākotnējo svaru katrā testa traukā. Ja zivis vēlreiz sver 14. dienā, devu pēc tam pārrēķina. Zivīm nedod barību 24 stundas pirms svēršanas.

▼B

Neapēstā barība un fekālais materiāls no testa traukiem jāaizvāc katru dienu, ar atsūkšanu rūpīgi iztīrot katras tvertnes dibenu.

1.8.2.4. *Gaisma un temperatūra*

Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpiemēro testa sugai (1. papildinājums).

1.8.3. **Testa koncentrācijas**

Parasti ir vajadzīgas piecas testa vielas koncentrācijas neatkarīgi no testa plāna (skatīt 1.7.2. punktu). Priekšzināšanas par testa vielas toksicitāti (piemēram, no akūtās toksicitātes testa un/vai no diapazona atrašanas pētījuma) būtu noderīgas piemērotu testa apstākļu izvēlei. Ja izmanto mazāk par piecām koncentrācijām, tas jāpamato. Lielākā testētā koncentrācija nedrīkstētu pārsniegt vielas šķīdības robežu ūdenī.

Ja izejas šķīduma pagatavošanā izmanto šķīdību veicinošu vielu, tās galakoncentrācijai nevajadzētu būt lielākai par 0,1 ml/l un tai, vēlams, būtu jābūt vienādai visos testa traukos (skatīt 1.6.3. punktu). Tomēr jāpieliek visas pūles, lai izvairītos no šādu vielu lietošanas.

1.8.4. **Kontroles mēģinājumi**

Atšķaidīšanas ūdens kontroles mēģinājumu skaits ir atkarīgs no testa plāna (skatīt 1.7. līdz 1.7.2. punktu). Ja izmanto šķīdību veicinošu vielu, tad arī šķīdību veicinošai vielai jāiekļauj tāds pats kontroles mēģinājumu skaits kā atšķaidīšanas ūdenim.

1.8.5. **Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums**

Testa laikā testa vielas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos (skatīt turpmāk).

Caurplūdes testos atšķaidīšanas ūdens un toksiskā izejas šķīduma plūsmas ātrums jāpārbauda regulāros intervālos, vēlams, ik dienas, un tas testa laikā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Ja ir sagaidāms, ka testa vielas koncentrācijas būs ± 20 % no nominālajiem lielumiem (t. i., 80–120 % diapazonā, skatīt 1.6.2 un 1.6.3 punktu), ir ieteicams vismaz lielāko un mazāko testa koncentrāciju analizēt testa sākumā un reizi nedēļā pēc tam. Ja ir sagaidāms, ka testa vielas koncentrācija testā nesaglabāsies ± 20 % no nominālā lieluma (pamatojoties uz testa vielas stabilitātes datiem), ir jāanalizē visas testa koncentrācijas, bet jāievēro tas pats režīms.

Pusstatiskajos (atjaunošanas) testos, ja ir sagaidāms, ka testa vielas koncentrācija saglabāsies ± 20 % no nominālā lieluma, ir ieteicams vismaz lielāko un mazāko testa koncentrāciju analizēt svaigi pagatavotu un tieši pirms atjaunošanas pētījuma sākumā un pēc tam katru nedēļu. Ja ir sagaidāms, ka testa vielas koncentrācija testā nesaglabāsies ± 20 % no nominālā lieluma, visas testa koncentrācijas ir jāanalizē, ievērojot to pašu režīmu, kāds ir stabilākām vielām.

▼B

Ir ieteicams rezultātu aprēķinā pamatoties uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja ir pieejami dati, kas rāda, ka testa vielas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši saglabājusies ± 20 % no nominālā lieluma vai no izmērītās sākuma koncentrācijas, tad rezultātu aprēķins var pamatoties uz nominālajiem vai izmērītajiem lielumiem.

Paraugi var būt jāfiltrē (piemēram, izmantojot 0,45 μm poru lielumu) vai jācentrifugē. Ieteicamā procedūra ir centrifugēšana. Tomēr arī filtrēšana var būt pieņemama, ja testa materiāls neadsorbējas uz filtra.

Testa laikā visos testa traukos ir jāmēra izšķīdušais skābeklis, pH un temperatūra. Kopējā cietība, sārmainība un sāļums (attiecīgā gadījumā) jāmēra kontroles mēģinājumos un vienā traukā ar lielāko koncentrāciju. Izšķīdušais skābeklis un sāļums (attiecīgā gadījumā) jāmēra trīs reizes (testa sākumā, vidū un beigās). Pusstatiskajos testos ir ieteicams izšķīdušo skābekli mērīt biežāk, vēlams, pirms katras ūdens atjaunošanas un pēc tās vai vismaz reizi nedēļā. pH jāmēra katras ūdens atjaunošanas sākumā un beigās statiskajos atjaunošanas testos un vismaz reizi nedēļā caurplūdes testos. Cietība un sārmainība jāmēra katrā testā vienu reizi. Temperatūru vēlams uzraudzīt nepārtraukti vismaz vienā testa traukā.

1.8.6. **Novērojumi**

Svars: testa beigās visas izdzīvojušās zivis ir jānosver mitras (nosusinātas) vai nu grupās atbilstīgi testa traukam, vai atsevišķi. Dzīvnieku svēršanai atbilstīgi testa traukam ir priekšroka pret individuālu svēršanu, kurai zivis ir individuāli jāmarķē. Individuālas svēršanas gadījumā, lai noteiktu atsevišķu zivju īpatnējo augšanas ātrumu, izvēlētajai marķēšanas tehnikai būtu jāizvairās radīt dzīvniekiem stresu (piemērotas būtu alternatīvas marķēšanai ar saldēšanu, piemēram, krāsainas smalkas makšķerauklas lietošana).

Zivis testa laika posmā jāapskata katru dienu un jāatzīmē visas ārējās anomālijas (piemēram, asiņošana, krāsas zudums) un anomāla izturēšanās. Jāreģistrē mirstība un nedzīvās zivis jāaizvāc iespējami drīz. Nedzīvās zivis neaizstāj, noslogojums ir pietiekams, lai izvairītos no ietekmes uz augšanu, ko rada zivju skaita maiņa tvertnē. Tomēr ir jāpielāgo barības daudzums.

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Ir ieteicams testa plānošanā un analīzē iesaistīt statistiķi, jo testa metode ļauj ievērojami mainīt eksperimenta plānu, piemēram, testa trauku skaitu, testa koncentrāciju skaitu, zivju skaitu utt. Ņemot vērā testa plānā pieejamās izvēles iespējas, šeit nav doti konkrēti norādījumi par statistisko procedūru.

▼B

Augšanas ātrumi nav jāaprēķina testa traukiem, kuros mirstība pārsniedz 10 %. Tomēr mirstība jānorāda visām testa koncentrācijām.

Neatkarīgi no tā, kādu metodi izmanto datu analīzē, centrālais jēdziens ir īpatnējais augšanas ātrums r starp momentu t_1 un momentu t_2. To var definēt vairākos veidos atkarībā no tā, vai zivis ir vai nav individuāli marķētas un vai ir jāizmanto vidējais lielums tvertnē.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kur:

r_1 = atsevišķas zivs īpatnējais augšanas ātrums,

r_2 = vidējais īpatnējais augšanas ātrums tvertnē,

r_3 = "pseidoīpatnējais" augšanas ātrums,

w_1, w_2 = konkrētas zivs svars attiecīgi laika punktā t_1 un t_2,

$\log_e w_1$ = atsevišķas zivs svara logaritms pētījuma laika posma sākumā,

$\log_e w_2$ = atsevišķas zivs svara logaritms pētījuma laika posma beigās,

$\log_e W_1$ = lielumu w_1 logaritmu vidējais lielums zivīm tvertnē pētījuma laika posma sākumā,

$\log_e W_2$ = lielumu w_2 logaritmu vidējais lielums zivīm tvertnē pētījuma laika posma beigās,

t_1, t_2 = laiks (dienās) pētījuma laika posma sākumā un beigās,

r_1, r_2, r_3 var aprēķināt 0–28 dienu laika posmam un attiecīgā gadījumā (t. i., ja ir izdarīti mērījumi 14. dienā) 0–14 un 14–28 dienu laika posmiem.

2.1.1. **Rezultātu analīze ar regresiju (koncentrācijas–iedarbības modelēšanu)**

Šī analīzes metode pielāgo piemērotu matemātisku sakarību starp īpatnējo augšanas ātrumu un koncentrāciju un no šīs sakarības dod iespēju novērtēt EC_x, t. i., jebkuru vajadzīgo EC lielumu. Izmantojot šo metodi, r aprēķins atsevišķām zivīm (r_1) nav vajadzīgs, un tā vietā analīze var balstīties uz tvertnei vidējo r lielumu (r_2). Šī pēdējā metode ir atzīstama par labāku. Tā ir arī piemērotāka ļoti mazu zivju izmantošanas gadījumā.

Lai aplūkotu koncentrācijas sakarību ar iedarbību, tvertnei vidējie īpatnējie augšanas ātrumi (r_2) būtu grafiski jāatliek pret koncentrāciju.

▼B

Lai izteiktu sakarību starp r_2 un koncentrāciju, jāizvēlas piemērots modelis, un tā izvēle ir attiecīgi jāpamato.

Ja katrā tvertnē izdzīvojušo zivju skaits nav vienāds, tad neatkarīgi no tā, vai modelis ir vienkāršs vai nelineārs, modeļa pielāgošanas procesā jānosaka svērtie lielumi, lai ņemtu vērā grupu nevienādos lielumus.

Modeļa pielāgošanas metodei ir jānodrošina, piemēram, EC_{20} un tās izkliedes novērtējums (standarta kļūda vai ticamības intervāls). Pielāgotā modeļa grafiskais attēls jāparāda attiecībā uz datiem, tā lai būtu redzama modeļa pielāgošanas atbilstība (8) (18) (19) (20).

2.1.2. ***LOEC* novērtēšanas rezultātu analīze**

Ja testā ir iekļautas paralēlo mēģinājumu tvertnes visiem koncentrāciju līmeņiem, *LOEC* novērtēšana var pamatoties uz tvertnei vidējā īpatnējā augšanas ātruma dispersiju analīzi (*ANOVA*) (skatīt 2.1. punktu), pēc tam izmantojot piemērotu metodi (piemēram, Daneta vai Viljamsa testu (12) (13) (14) (21)) katras koncentrācijas vidējā r salīdzināšanai ar kontroles mēģinājuma vidējo r, lai noskaidrotu mazāko koncentrāciju, kurai atšķirība ir nozīmīga 0,05 varbūtības līmenī. Ja parametriskajām metodēm vajadzīgie pieņēmumi nav atbilstoši – nenormāls sadalījums (piemēram, Šapiro-Vilksa tests) vai heterogēnas dispersijas (Bartleta tests), tad dispersiju homogenizēšanai būtu jāapsver datu pārveidošana pirms *ANOVA* izdarīšanas vai jāizdara svērta *ANOVA*.

Ja paralēlo mēģinājumu tvertnes katrai koncentrācijai testā nav iekļautas, *ANOVA*, kas pamatojas uz tvertnēm, būs bez jēgas vai neiespējama. Šajā gadījumā pieņemams kompromiss ir *ANOVA* izdarīšana, balstoties uz atsevišķu zivju "pseidoīpatnējo" augšanas ātrumu r_3.

Katras testa koncentrācijas vidējo r_3 pēc tam var salīdzināt ar kontroles grupas vidējo r_3. Pēc tam tāpat kā iepriekš var noskaidrot *LOEC*. Ir jāievēro, ka šī metode neņem vērā mainīgumu starp tvertnēm vairāk, kā tā ievēro mainīgumu starp atsevišķām zivīm, un šajā ziņā nedod nekādu aizsardzību. Tomēr pieredze ir parādījusi (8), ka mainīgums starp tvertnēm ir ļoti mazs, salīdzinot ar mainīgumu tvertnē (t. i., starp zivīm). Ja analīzē atsevišķas zivis neiekļauj, ir jāparedz nejaušo kļūdu identifikācijas metode un tās izmantošanas pamatojums.

2.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Rezultāti būtu jāinterpretē piesardzīgi, ja izmērītās toksiskās vielas koncentrāciju līmeņi testa šķīdumos ir tuvi analītiskās metodes atklāšanas robežai vai ja pusstatiskajos testos testa vielas koncentrācija samazinās starp brīdi, kad šķīdums ir svaigi pagatavots, un brīdi pirms atjaunošanas.

2.3. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

▼B

2.3.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identificēšanas dati, iekļaujot tīrību un attiecīgā gadījumā testa vielas kvantitatīvās noteikšanas analītisko metodi.

2.3.2. **Testa suga:**

— zinātniskais nosaukums, ja iespējams,

— līnija, lielums, piegādātājs, iepriekšēja apstrāde utt.

2.3.3. **Testa apstākļi:**

— izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatiskā/atjaunošanas, caurplūdes, noslogojums, apdzīvotības blīvums utt.),

— testa plāns (piemēram, testa trauku skaits, testa koncentrācijas un paralēlie testi, zivju skaits uz trauku),

— izejas šķīduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (ir jānorāda šķīšanu veicinošā viela, ja to lieto, un tās koncentrācija),

— nominālās testa koncentrācijas, izmērīto lielumu vidējie lielumi un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar kādu novirzes iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi attiecas uz testa vielas koncentrācijām īstā šķīdumā,

— atšķaidīšanas ūdens parametri: testa vides pH, cietība, sārmainība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikumu hlora līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis, suspendētās cietās daļiņas, sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi,

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija,

— sīka informācija par barošanu (piemēram, barības veids(-i), avots, dotais daudzums un biežums).

2.3.4. **Rezultāti:**

— pierādījumi, ka kontroles grupa atbilst derīguma kritērijiem attiecībā uz izdzīvotību, un dati par mirstību katrā no testa koncentrācijām,

— izmantotā statistiskās analīzes metode, statistika, kas pamatojas uz paralēlajiem mēģinājumiem vai atsevišķām zivīm, datu apstrāde un lietotās metodes pamatojums,

— tabulas dati par atsevišķo zivju svaru un zivju vidējo svaru 0., 14. (ja ir izdarīti mērījumi) un 28. dienā, tvertnei vidējie īpatnējie augšanas ātrumi vai pseidoīpatnējie augšanas ātrumi (attiecīgā gadījumā) 0–28 dienu laika posmā vai, iespējams, 0–14 un 14–28 dienu laika posmā,

— statistiskās analīzes rezultāti (t. i., regresijas analīze vai *ANOVA*), vēlams, tabulas vai grafikas veidā, un *LOEC* (p = 0,05) un *NOEC* vai ECx, attiecīgā gadījumā, ja iespējams, standarta kļūdas,

▼B

— zivju neparastu reakciju biežums un testa vielas radītā redzamā ietekme.

3. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

(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). EEK 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 EEK 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, p. 1855–1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and H fte 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 81.

(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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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. p. 288.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, p. 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. p. 12.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, p. 510–531.

▼B

1. PAPILDINĀJUMS

TESTĒŠANAI ETEICAMĀS ZIVJU SUGAS UN PIEMĒROTIE TESTA APSTĀKĻI

Suga	Ieteicamais testa temperatūru diapazons (°C)	Fotoperiods (stundas)	Ieteicamais zivju sākotnējā svara diapazons (g)	Vajadzīgā mērījumu precizitāte	Noslogojums (g/l)	Apdzīvotības blīvums (litrā)	Barība	Testa ilgums (dienas)
Ieteicamās sugas:								
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele	12,5—16,0	12–16	1–5	Līdz tuvākajiem 100 mg	1,2—2,0	4	Sausā patentētā lašu dzimtas zivju mazuļu barība	≥ 28
Citas labi dokumentētas sugas:								
Danio rerio Zebras zivs	21–25	12–16	0,050—0,100	Līdz tuvākajam 1 mg	0,2—1,0	5–10	Dzīva barība (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Rīsa zivs (Medaka)	21–25	12–16	0,050—0,100	Līdz tuvākajam 1 mg	0,2—1,0	5–20	Dzīva barība (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

2. PAPILDINĀJUMS

DAŽAS PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

Viela	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikumu hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenīli	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

▼B

3. PAPILDINĀJUMS

Koncentrāciju logaritmiskās rindas, kas piemērotas toksicitātes testam (9)

Aile (koncentrāciju skaits starp 100 un 10 vai starp 10 un 1) (*)						
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
						13
						1,0

(*) No ailes var izvēlēties piecu (vai vairāku) secīgu koncentrāciju rindu. Viduspunkti starp koncentrācijām ailē x ir atrodami ailē 2x+1. Uzskaitītie lielumi var pārstāvēt koncentrācijas, kas izteiktas tilpuma vai svara procentos (mg/l vai µg/l). Lielumus attiecīgā gadījumā var reizināt vai dalīt ar jebkuru skaitļa 10. pakāpi. 1. aili var izmantot, ja ir ievērojama nenoteiktība par toksicitātes līmeni.

▼B

C.15. ĪSTERMIŅA TOKSICITĀTES TESTS ZIVĪM EMBRIJA UN DZELTENUMMAISA ATTĪSTĪBAS POSMOS

1. METODE

Šī akūtās toksicitātes testa metode ir ESAO TG 212 (1998) kopija.

1.1. IEVADS

Šis īstermiņa toksicitātes tests zivīm embrija un dzeltenummaisa attīstības posmos ir īstermiņa tests, kurā tās pakļauj iedarbībai dzīves posmos no tikko apaugļotas oliņas līdz dzeltenummaisa posma beigām. Embrija un dzeltenummaisa posma testā barošana nav paredzēta, un tātad tests būtu jāpabeidz, kamēr zivju mazuļi dzeltenummaisa attīstības posmā vēl barojas no dzeltenummaisa.

Tests ir paredzēts, lai noteiktu ķimikāliju letālo un, ierobežotā mērā, subletālo ietekmi uz testētajām konkrētajām attīstības stadijām un sugām. Testam būtu jāsniedz noderīga informācija, kas varētu a) veidot tiltu starp letāliem un subletāliem testiem, b) tikt izmantota kā skrīninga tests pilnīgam dzīves sākumposmu testam vai hroniskās toksicitātes testam un c) tikt izmantota sugu testēšanai, ja audzēšanas metodes nav pietiekami pavirzījušās, lai ietvertu pārejas laika posmu no endogēnas barošanas uz eksogēnu.

Būtu jāpatur prātā, ka tikai testi, kas iekļauj visus zivju dzīves cikla posmus, parasti var sniegt precīzu vērtējumu par ķimikāliju hronisko toksicitāti zivīm un ka jebkura samazināta iedarbība attiecībā uz dzīves posmiem var samazināt jutību un tādā veidā hroniskā toksicitāte var tikt novērtēta par zemu. Tādēļ ir sagaidāms, ka embrija un dzeltenummaisa posma tests būs mazāk jutīgs nekā pilns dzīves sākumposmu tests, jo īpaši attiecībā uz ļoti lipofīlām ķimikālijām (log P_{ow} > 4) un ķimikālijām ar specifisku toksiskās iedarbības veidu. Tomēr mazākas atšķirības jutībā starp diviem testiem būtu sagaidāmas ķimikālijām ar nespecifisku narkotisku darbības veidu (1).

Pirms šā testa publicēšanas lielākā daļa pieredzes ar šo embrija un dzeltenummaisa testu ir bijusi iegūta ar saldūdens zivi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae* ar parasto nosaukumu zebras zivs). Tādēļ sīkāk izstrādāti norādījumi par testa izdarīšanu ar šīm sugām ir sniegti 1. papildinājumā. Tas neizslēdz iespēju izmantot citas sugas, par kurām arī ir pieejama pieredze (1. tabula).

1.2. DEFINĪCIJAS

Mazākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*): testa vielas mazākā testētā koncentrācija, pie kuras ir novērots, ka vielai ir nozīmīga ietekme (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontroles testu. Tomēr pie visām testa koncentrācijām, kas lielākas par *LOEC*, ir jābūt negatīvai ietekmei, kura ir vienāda vai lielāka par negatīvo ietekmi, kas novērota pie *LOEC*.

Nenovērojamas ietekmes koncentrācija (*NOEC*): ir testa koncentrācija tieši zem *LOEC*.

▼B

1.3. TESTA PRINCIPS

Zivis embrija un dzeltenummaisa attīstības posmos pakļauj ūdenī izšķīdinātai testa vielai koncentrāciju diapazonā. Atbilstīgi ziņojumam ir iespējams izvēlēties starp pusstatisko un caurplūdes procedūru. Izvēle ir atkarīga no testa vielas īpašībām. Testu sāk, ievietojot apaugļotas oliņas testa tvertnēs, un beidz tieši pirms tam, kad kāda kāpura dzeltenummaiss jebkurā no testa tvertnēm ir pilnīgi uzsūcies, vai pirms kontroles grupā sākas mirstība bada dēļ. Letālo un subletālo ietekmi novērtē un salīdzina ar lielumiem kontroles grupā, lai noteiktu mazākās novērojamās ietekmes koncentrāciju un no tās noteiktu nenovērojamas ietekmes koncentrāciju. Alternatīvi šīs ietekmes var analizēt, izmantojot regresijas modeli, lai novērtētu koncentrāciju, kas izraisa doto procentuālo ietekmi (t. i., LC/EC_x, kur x ir noteikta ietekme procentos).

1.4. INFORMĀCIJA PAR TESTA VIELU

Būtu jābūt pieejamiem akūtās toksicitātes testa (skatīt C.1. metodi) rezultātiem, kas, vēlams, iegūti ar šim testam izraudzīto sugu. Rezultāti var būt noderīgi, izvēloties dzīves sākumposmu testiem piemērotu koncentrāciju diapazonu. Jāzina testa vielas šķīdība ūdenī (iekļaujot šķīdību testā izmantojamā ūdenī) un tvaika spiediens. Jābūt pieejamai ticamai analītiskai metodei vielas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos, kuras precizitāte un atklāšanas robeža ir zināma un norādīta ziņojumā.

Informācija, kas var būt noderīga, izstrādājot testa apstākļus, iekļauj testa vielas struktūrformulu, tīrību, stabilitāti gaismas ietekmē, stabilitāti testa apstākļos, pKa, P_{ow} un vieglas bionoārdīšanās testa rezultātus (skatīt C.4. metodi).

1.5. TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— apaugļoto oliņu kopējai izdzīvotībai kontroles grupā un attiecīgā gadījumā traukos, kuros ir tikai šķīdinātājs, ir jābūt lielākai vai vienādai ar 2. un 3. papildinājumā norādītajiem robežlielumiem,

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt starp 60 un 100 % no piesātināšanas ar gaisu lieluma,

— ūdens temperatūra nedrīkst vairāk par ± 1,5 °C atšķirties starp testa tvertnēm vai starp secīgām dienām jebkurā brīdī testa laikā, un tai jābūt temperatūru intervālā, kas norādīts attiecīgajai testa sugai (2. un 3. papildinājums).

▼B

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Testa tvertnes**

Var izmantot jebkurus stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla traukus. Trauku izmēriem jābūt pietiekami lieliem, lai tie atbilstu noslogojumam (skatīt 1.7.1.2. punktu). Ir ieteicams testa tvertnes izvietot testa izpildes vietā pēc nejaušās izvēles. Pēc nejaušas izvēles izvietotu bloku plāns, kur katrā blokā ir pārstāvēta katra veida apstrāde, ir vēlamāks par pilnīgi nejaušas izvēles izvietojuma plānu, ja laboratorijā ir sistemātiskas ietekmes, ko var kontrolēt, izmantojot izvietojumu pa blokiem. Izvietošana pa blokiem, ja to lieto, jāņem vērā turpmākajā datu analīzē. Testa tvertnes jāaizsargā no nevēlamiem traucējumiem.

1.6.2. **Zivju sugu izvēle**

Ieteicamās zivju sugas ir norādītas 1.A tabulā. Tas neizslēdz citu sugu izmantošanu (piemēri ir 1.B tabulā), bet testa procedūra var būt jāpielāgo, lai nodrošinātu piemērotus testa apstākļus. Tādā gadījumā jāprotokolē sugas izvēles pamatojums un eksperimenta metode.

1.6.3. **Vaislas zivju turēšana**

Dati par vaislas zivju turēšanu piemērotos apstākļos ir atrodami ESAO TG 210 ([1]) un (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4. **Rīkošanās ar embrijiem un kāpuriem**

Embrijus un kāpurus galvenās tvertnes iekšpusē var pakļaut iedarbībai, ievietotus mazākos traukos, kuru sāni vai gali veidoti no sieta, lai testa šķīdums varētu plūst cauri traukiem. Neturbulentu plūsmu caur šiem mazajiem traukiem var izraisīt, tos piekarot turētājam, kas tos kustina augšup un lejup, tā, lai organismi visu laiku būtu iegremdēti. Var izmantot arī sifona skalošanas sistēmu. Lašu dzimtas zivju apaugļotas oliņas var balstīties uz paliktņiem vai sietiem ar pietiekami lielām atverēm, lai kāpuri pēc izšķilšanās varētu tām izkrist cauri. Lai pusstatiskajos testos ar pilnīgu atjaunošanu ik dienas embrijus un kāpurus izņemtu, ir piemēroti lietot Pastēra pipetes (skatīt 1.6.6. punktu).

Ja oliņu turēšanai galvenajā testa traukā ir izmantoti oliņu turētāji, režģi vai sieti, šie šķēršļi pēc kāpuru izšķilšanās ([1]) jāaizvāc, izņemot gadījumu, ja sieti jāsaglabā, lai novērstu zivju izkļūšanu. Ja kāpuri ir jāpārvieto, tos nedrīkstētu pakļaut gaisa iedarbībai un zivju izņemšanai no oliņu traukiem nedrīkst izmantot tīkliņus (tādu piesardzību var neievērot ar dažām mazāk vārīgām sugām, piemēram, karpām). Šo pārvietošanu grafiks mainās atkarībā no sugas, un pārvietošana var nebūt vienmēr vajadzīga. Pusstatiskajai metodei var izmantot vārglāzes vai seklus traukus un vajadzības gadījumā tos aprīkot ar sietu, kas nedaudz pacelts virs vārglāzes dibena. Ja šo trauku tilpums ir pietiekams, lai atbilstu noslogojuma prasībām, (skatīt 1.7.1.2. punktu) embriju vai kāpuru pārnešana var nebūt vajadzīga.

([1]) OECD, Paris (1992). Test Guideline 210, “Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5. **Ūdens**

Jebkurš ūdens, kas atbilst 4. papildinājumā uzskaitītajām pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajām īpašībām un kurā testa suga kontroles mēģinājumā uzrāda izdzīvotību, kas ir vismaz tikpat laba kā 2. un 3. papildinājumā aprakstītā, ir piemērots testa ūdens. Tā kvalitātei testa laika posmā jābūt nemainīgai. pH būtu jābūt nemainīgam ± 0,5 pH vienību diapazonā. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, veidojot kompleksus ar testa vielu) vai negatīvi neietekmē vaislas zivju darbību, noteiktos intervālos jāņem paraugi analīzei. Smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca, Mg, Na, K, Cl un SO_4), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendētu cietu vielu mērījumi, piemēram, būtu jāveic reizi trijos mēnešos, ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga. Ja ir parādīts, ka ūdens kvalitāte ir nemainīga vismaz viena gada laikā, noteikšanas var būt retākas un intervāli var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos).

1.6.6. **Testa šķīdumi**

Izraudzītās koncentrācijas testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejas šķīdumu.

Izejas šķīdumu vēlams pagatavot, vienkārši maisot vai kratot testa vielu ar atšķaidīšanas ūdeni, izmantojot mehāniskus līdzekļus (piemēram, kratītāju vai ultraskaņu). Piemērota koncentrēta izejas šķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas). Cik vien iespējams, būtu jāizvairās izmantot šķīdinātājus vai disperģējošas vielas (šķīdību veicinošas vielas); tomēr dažos gadījumos šādi savienojumi var būt vajadzīgi, lai iegūtu piemērotas koncentrācijas izejas šķīdumu. Piemērotu šķīdinātāju piemēri ir acetons, etilspirts, metilspirts, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Piemērotu disperģējošu vielu piemēri ir *Cremophor* RH40, *Tween* 80, 0,01 % metilceluloze un HCO-40. Ir jābūt uzmanīgam, lietojot viegli bionoārdāmas vielas (piemēram, acetonu) un/vai viegli gaistošus savienojumus, jo tie var radīt problēmas ar baktēriju augšanu caurplūdes testos. Ja lieto šķīdību veicinošu vielu, tā nedrīkst jūtami ietekmēt izdzīvotību vai redzami negatīvi ietekmēt attīstības sākumstadijas, ko var atklāt kontroles mēģinājumā, kuru izdara ar šķīdinātāju vien. Tomēr būtu jāpieliek visas pūles, lai izvairītos no šādu vielu lietošanas.

Lietojot pusstatisko metodi, var izmantot divas atšķirīgas atjaunošanas procedūras: i) tīros traukos sagatavo jaunus testa šķīdumus un izdzīvojušās oliņas un kāpurus uzmanīgi pārnes jaunajos traukos nelielā vecā šķīduma tilpumā, izvairoties pakļaut gaisa iedarbībai vai ii) testa organismus atstāj traukos, kamēr apmaina daļu (vismaz trīs ceturtdaļas) no testa ūdens. Vides atjaunošanas biežums ir atkarīgs no testa vielas stabilitātes, bet ir ieteicams ūdeni atjaunot katru dienu. Ja no iepriekšējiem stabilitātes testiem (skatīt 1.4. punktu) ir zināms, ka testa vielas koncentrācija atjaunošanas laika posmā nav stabila (t. i., ārpus 80–120 % diapazona no nominālās koncentrācijas vai zem 80 % no izmērītās sākotnējās koncentrācijas), tad jāapsver caurplūdes testa izmantošana. Katrā ziņā jārūpējas, lai izvairītos no stresa radīšanas kāpuriem ūdens atjaunošanas laikā.

▼B

Lai piegādātu testa tvertnēm rindu koncentrāciju, caurplūdes testos ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti piegādā un atšķaida testa vielas izejas šķīdumu (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma). Izejas šķīdumu un atšķaidīšanas ūdens plūsmas ātrumi testa laikā jāpārbauda noteiktos intervālos, vēlams, reizi dienā, un tie testa laikā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Par piemērotu ir atzīts plūsmas ātrums, kas līdzvērtīgs vismaz pieciem testa tvertnes tilpumiem 24 stundās (2).

1.7. PROCEDŪRA

Noderīga informācija par zivju embriju un dzeltenummaisa attīstības posma toksicitātes testu izdarīšanu ir pieejama literatūrā, kuras daži piemēri ir iekļauti šā teksta literatūras sarakstā (7) (8) (9).

1.7.1. **Iedarbības apstākļi**

1.7.1.1. *Ilgums*

Testu vēlams sākt 30 minūšu laikā pēc oliņu apaugļošanas. Embrijus iegremdē testa šķīdumā pirms blastodiska dalīšanās stadijas sākuma vai iespējami drīz pēc tam un katrā ziņā pirms gastrulas stadijas sākuma. Oliņām, kas iegūtas no komercpiegādātāja, var nebūt iespējams testu sākt tieši pēc apaugļošanas. Tā kā testa jutību var ievērojami ietekmēt testa sākuma aizkavēšanās, tests būtu jāsāk astoņu stundu laikā pēc apaugļošanas. Tā kā vielas iedarbības laika posmā kāpurus nebaro, tests būtu jābeidz, tieši pirms kāda kāpura dzeltenummaiss jebkurā testa traukā ir pilnīgi uzsūcies vai pirms kontroles grupā sākas mirstība bada dēļ. Ilgums būs atkarīgs no izmantotās sugas. Daži ieteicamie ilgumi ir 2. un 3. papildinājumā.

1.7.1.2. *Noslogojums*

Apaugļoto oliņu skaitam testa sākumā būtu jābūt pietiekamam, lai atbilstu statistikas prasībām. Oliņas jāsadala starp apstrādes veidiem pēc nejaušās izvēles, un katrai koncentrācijai jāizmanto vismaz 30 apaugļotas oliņas, sadalot vienādi (vai iespējami vienādi, jo, izmantojot dažas sugas, var būt grūti iegūt vienādas partijas) starp vismaz trim paralēlo testu traukiem. Noslogojumam (biomasai testa šķīduma tilpuma vienībā) jābūt pietiekami mazam, lai bez aerācijas varētu uzturēt izšķīdušā skābekļa koncentrāciju vismaz 60 % no piesātinājuma lieluma. Caurplūdes testiem ir ieteikts noslogojums, kas nav lielāks par 0,5 g/l 24 stundās un nav lielāks par 5 g/l šķīduma jebkurā laikā (2).

1.7.1.3. *Gaisma un temperatūra*

Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpiemēro testa sugai (2. un 3. papildinājums). Temperatūras uzraudzības nolūkiem var būt lietderīgi izmantot papildu testa trauku.

▼B

1.7.2. **Testa koncentrācijas**

Parasti ir vajadzīgas piecas testa vielas koncentrācijas, kas atšķiras ar nemainīgu koeficientu, ne lielāku par 3,2. Izvēloties testa koncentrāciju diapazonu, būtu jāņem vērā līkne, kas attēlo LC_{50} atkarību no iedarbības laika akūtās toksicitātes pētījumā. Dažos gadījumos var būt lietderīgi izmantot mazāk nekā piecas koncentrācijas, piemēram, pieļaujamā daudzuma testos, un šaurāku koncentrāciju intervālu. Ja izmanto mazāk par piecām koncentrācijām, tas būtu jāpamato. Vielas koncentrācijas, kas lielākas par 96 stundu LC_{50} vai 100 mg/l, izvēloties no abiem mazāko lielumu, nav jātestē. Vielas nebūtu jātestē virs to šķīdības robežas testa ūdenī.

Ja izmanto šķīdību veicinošu vielu, lai vieglāk pagatavotu testa šķīdumus (skatīt 1.6.6. punktu), tās galakoncentrācija testa traukos nedrīkst būt lielāka par 0,1 ml/l, un tai jābūt vienādai visos testa traukos.

1.7.3. **Kontroles mēģinājumi**

Papildus testa sērijai vajadzētu izdarīt vienu kontroles mēģinājumu ar atšķaidīšanas ūdeni (attiecīgā gadījumā izdarot paralēlos mēģinājumus) un arī attiecīgā gadījumā vienu kontroles mēģinājumu ar šķīdību veicinošo vielu (attiecīgā gadījumā izdarot paralēlos mēģinājumus).

1.7.4. **Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums**

Testa laikā testa vielas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos.

Pusstatiskajos testos, ja testa vielas koncentrācija, sagaidāms, paliks ± 20 % no nominālās (t. i., 80–120 % diapazonā; skatīt 1.4. un 1.6.6. punktu), ir ieteicams vismaz lielāko un mazāko testa koncentrāciju analizēt svaigi pagatavotu un tieši pirms atjaunošanas vismaz trijos laika punktos, kas vienmērīgi izvietoti testa laikā (t. i., analīzes būtu jāveic tā paša šķīduma paraugam, kas ir svaigi pagatavots un pie atjaunošanas).

Ja nav sagaidāms, ka testa vielas koncentrācija testā saglabāsies ± 20 % no nominālā lieluma (pamatojoties uz testa vielas stabilitātes datiem), ir jāanalizē visas testa koncentrācijas, svaigi pagatavotas un pie atjaunošanas, bet jāievēro tas pats režīms (t. i., vismaz trijos laika punktos, kas vienmērīgi izvietoti testa laikā). Testa vielas koncentrāciju noteikšana pirms atjaunošanas ir jāizdara tikai vienā paralēlā mēģinājuma traukā katrai testa koncentrācijai. Noteikšanas jāizdara ne retāk par septiņām dienām. Ir ieteicams rezultātu aprēķinā pamatoties uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja ir pieejami dati, kas rāda, ka testa vielas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši saglabājusies ± 20 % no nominālā lieluma vai no izmērītās sākuma koncentrācijas, tad rezultātu aprēķins var pamatoties uz nominālajiem vai izmērītajiem sākotnējiem lielumiem.

Ja izmanto caurplūdes testu, ir piemērots paraugu ņemšanas režīms, kas ir līdzīgs režīmam, kurš aprakstīts pusstatiskajiem testiem (bet šajā gadījumā nav piemērojama "veco" šķīdumu mērīšana). Tomēr, ja testa ilgums ir lielāks par septiņām dienām, var būt ieteicams pirmajā nedēļā palielināt paraugu ņemšanas reižu skaitu (piemēram, trīs mērījumu komplekti), lai nodrošinātu, ka testa koncentrācijas paliek stabilas.

▼B

Paraugi var būt jāfiltrē (piemēram, izmantojot 0,45 μm poru lielumu) vai jācentrifugē. Tomēr, tā kā ne centrifugēšana, ne filtrēšana vienmēr neatdala testa vielas bionepieejamo frakciju no tās, kas ir biopieejama, paraugus minētajai apstrādei var nepakļaut.

Testa laikā visos testa traukos jāmēra izšķīdušais skābeklis, pH un temperatūra. Kopējā cietība un sāļums (attiecīgā gadījumā) jāmēra kontroles mēģinājumos un vienā traukā ar lielāko koncentrāciju. Izšķīdušais skābeklis un sāļums (attiecīgā gadījumā) būtu jāmēra vismaz trīs reizes (testa sākumā, vidū un beigās). Pusstatiskajos testos ir ieteicams izšķīdušo skābekli mērīt biežāk, vēlams, pirms katras ūdens atjaunošanas un pēc tās vai vismaz vienreiz nedēļā. pH jāmēra katras ūdens atjaunošanas sākumā un beigās pusstatiskajos testos un vismaz reizi nedēļā caurplūdes testos. Cietība jāmēra katrā testā vienu reizi. Temperatūra jāmēra katru dienu, un to būtu vēlams nepārtraukti uzraudzīt vismaz vienā testa traukā.

1.7.5. **Novērojumi**

1.7.5.1. *Embrionālās attīstības stadijas*

Embrionālā stadija (t. i., gastrulas stadija) testa vielas iedarbības sākumā jāpārbauda iespējami precīzi. To var izdarīt, izmantojot pienācīgi saglabātu un notīrītu oliņu raksturīgu paraugu. Embrionālās attīstības stadiju apraksts un ilustrācijas ir atrodamas arī literatūrā (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Izšķilšanās un izdzīvotība*

Novērojumi par izšķilšanos un izdzīvotību jāizdara vismaz reizi dienā, un skaits jāprotokolē. Var būt vēlams testa sākumā izdarīt biežākus novērojumus (piemēram, reizi 30 minūtēs pirmo trīs stundu laikā), jo dažos gadījumos izdzīvotības laiki var būt nozīmīgāki nekā nāves gadījumu skaits vien (piemēram, ja ir akūta toksiska ietekme). Nedzīvie embriji un kāpuri būtu jāizņem, tikko tie pamanīti, jo tie var strauji sadalīties. Nedzīvos īpatņus izņemot, būtu ārkārtīgi jāuzmanās, lai nepiedurtos tuvu esošajām oliņām/kāpuriem vai tos fiziski netraumētu, jo tie ir ārkārtīgi vārīgi un jutīgi. Nāves kritēriji atšķiras atkarībā no dzīves posma:

— oliņām: jo īpaši agrīnās stadijās, izteikts gaismas caurlaidības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kas ir balta necaurredzama izskata cēlonis,

— embrijiem: ķermeņa kustību trūkums un/vai sirds pulsāciju trūkums, un/vai bezkrāsas blāvums sugām, kuru embriji parasti ir gaismu caurlaidīgi,

— kāpuriem: nekustīgums un/vai elpošanas kustību trūkums, un/vai sirds pulsāciju trūkums, un/vai centrālās nervu sistēmas balti blāvs krāsojums, un/vai atbildes reakcijas trūkums uz mehānisku kairinājumu.

▼B

1.7.5.3. *Nenormāls izskats*

Kāpuru skaits, kam ir nenormāla ķermeņa forma un/vai pigmentācija, un dzeltenummaisa uzsūkšanās stadija, būtu jāprotokolē adekvātos intervālos atkarībā no testa ilguma un aprakstītās nenormālības rakstura. Jāņem vērā, ka nenormāli embriji un kāpuri ir sastopami dabā un dažām sugām kontroles grupā(-ās) to kārtas lielums var būt daži procenti. Nenormālie dzīvnieki no testa traukiem jāizņem tikai tad, kad tie ir nobeigušies.

1.7.5.4. *Nenormāla uzvedība*

Nenormālības, piemēram, hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana un netipisks miera stāvoklis jāprotokolē atbilstošos intervālos atkarībā no testa ilguma. Šīs ietekmes, kaut arī grūti izsakāmas kvantitatīvi, var, ja tās novērotas, palīdzēt interpretēt mirstības datus, t. i., sniegt informāciju par vielas toksiskās darbības veidu.

1.7.5.5. *Garums*

Testa beigās ir ieteicams izmērīt individuālos garumus; var izmantot standarta garumu, garumu pēc Smita vai kopējo garumu. Tomēr, ja astes spura pūst vai spura erodē, jāizmanto standarta garumi. Parasti labi izdarītā testā garumu variācijas koeficientam starp paralēlajiem mēģinājumiem kontroles grupās jābūt ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Svars*

Testa beigās var nosvērt atsevišķos dzīvniekus; sausais svars (24 stundas pie 60 ^{o}C) ir vēlamāks par mitro svaru (zivis nosusinātas sausas). Parasti labi izdarītā testā svara variācijas koeficientam starp paralēlajiem mēģinājumiem kontroles grupās jābūt ≤ 20 %.

Šo novērojumu rezultātā statistiskajai analīzei būs pieejami šādi dati vai daļa no tiem:

— kumulatīvā mirstība,

— veselu kāpuru skaits testa beigās,

— šķilšanās sākuma laiks un beigu laiks (t. i., 90 % izšķilšanās katrā paralēlajā mēģinājumā),

— katru dienu izšķīlušos kāpuru skaits,

— testa beigās izdzīvojušo dzīvnieku garums (un svars),

— kāpuru skaits, kas ir deformēti vai kam ir nenormāls izskats,

— kāpuru skaits, kam ir nenormāla uzvedība.

▼B

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

2.1 REZULTĀTU APSTRĀDE

Ir ieteicams gan testa plānošanā, gan analīzē iekļaut statistiķi, jo metode ļauj ievērojami mainīt eksperimenta plānu, piemēram, testa tvertņu skaitu, testa koncentrāciju skaitu, apaugļoto oliņu sākuma skaitu un mērāmos parametrus. Ņemot vērā testa plānā pieejamās izvēles iespējas, konkrēti norādījumi par statistisko procedūru šeit nav doti.

Ja ir jānovērtē *LOEC/NOEC*, ir jāanalizē variācijas katrā paralēlo mēģinājumu kopā, izmantojot dispersiju analīzi (*ANOVA*) vai saistību tabulas procedūru. Lai vairākkārtīgi salīdzinātu atsevišķām koncentrācijām iegūtos rezultātus ar kontroles mēģinājumu rezultātiem, noderīga var būt Daneta metode (12) (13). Ir pieejami arī citi noderīgi piemēri (14) (15). Būtu jāaprēķina un jāprotokolē ietekmes lielums, kas ir nosakāms, izmantojot *ANOVA* vai citas procedūras (t. i., testa iespējas). Būtu jāatzīmē, ka ne visi 1.7.5.6. punktā uzskaitītie novērojumi ir piemēroti statistiskai analīzei, izmantojot *ANOVA*. Piemēram, kumulatīvo mirstību un veselīgu kāpuru skaitu testa beigās varētu analizēt, izmantojot varbūtības vienības metodes.

Ja ir jānovērtē LC/EC_x, interesējošajiem datiem jāpielāgo piemērota(-as) līkne(-es), piemēram, loģistiskā līkne, izmantojot tādu statistisko metodi kā mazāko kvadrātu metode vai nelineāro mazāko kvadrātu metode. Līkne(-es) jāparametrizē tā, lai interesējošo LC/EC_x un tās standartkļūdu varētu noteikt tieši. Tas ļoti atvieglo ticamības robežu aprēķinu ap LC/EC_x. Ja vien nav laba pamatojuma dot priekšroku atšķirīgiem ticamības līmeņiem, būtu jāizvēlas 95 % divpusējas ticamības robežas. Pielāgošanas procedūrai, vēlams, būtu jādod līdzeklis novērtēt, cik nozīmīgs ir pielāgotības trūkums. Līkņu pielāgošanai var izmantot grafiskās metodes. Regresijas analīze ir piemērota visiem novērojumiem, kas uzskaitīti 1.7.5.6. punktā.

2.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Ja izmērītās toksisko vielu koncentrācijas testa šķīdumos ir tuvas analītiskās metodes atklāšanas robežai, tad rezultāti būtu jāinterpretē piesardzīgi. Rezultātu interpretācija koncentrācijām, kas lielākas par vielas šķīdību ūdenī, arī būtu jāizdara piesardzīgi.

2.3. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

2.3.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identificēšanas dati, iekļaujot tīrību un attiecīgā gadījumā testa vielas kvantitatīvās noteikšanas analītisko metodi.

▼B

2.3.2. **Testa suga:**

— vaislas zivju zinātniskais nosaukums, līnija, skaits (t. i., cik mātīšu ir izmantots vajadzīgā oliņu skaita nodrošināšanai testā), izcelsme un apaugļoto oliņu savākšanas metode un turpmāka rīkošanās ar tām.

2.3.3. **Testa apstākļi:**

— izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatiskā vai caurplūdes, laika posms no apaugļošanas līdz testa sākumam, noslogojums utt.),

— fotoperiods(-i),

— testa plāns (piemēram, testa tvertņu un paralēlo mēģinājumu skaits, embriju skaits uz paralēlo mēģinājumu),

— izejas šķīduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (ir jānorāda šķīšanu veicinošā viela, ja to lieto, un tās koncentrācija),

— nominālās testa koncentrācijas, izmērītie lielumi, to vidējās novirzes un standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko šie dati iegūti, un, ja testa viela šķīst ūdenī koncentrācijās, kas ir mazākas par testētajām, būtu jāsniedz pierādījumi, ka mērījumi attiecas uz testa vielas koncentrācijām šķīdumā,

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikumu hlora līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis, suspendētās cietās daļiņas, sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi,

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija.

2.3.4. **Rezultāti:**

— priekšmēģinājumu rezultāti par testa vielas stabilitāti,

— pierādījumi, ka kontroles grupa atbilst testa sugas vispārējam izdzīvotības pieņemamības standartam (2. un 3. papildinājums),

— dati par mirstību/izdzīvotību embrija un kāpura stadijās un vispārējo mirstību/izdzīvotību,

— izšķilšanās dienas un izšķīlušos kāpuru skaits,

— dati par garumu (un svaru),

— morfoloģisko anomāliju biežums un apraksts, ja tādas ir,

— ietekmju uz izturēšanos biežums un apraksts, ja tādas ir,

— datu statistiskā analīze un apstrāde

— testiem, kas analizēti, izmantojot *ANOVA*, mazākās novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) pie p = 0,05 un nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*) katrai novērtētajai atbildes reakcijai, iekļaujot izmantoto statistisko procedūru aprakstu un norādi, kāda lieluma ietekmi var noteikt,

▼B

— testiem, kas analizēti, izmantojot regresijas metodi, LC/EC_x un ticamības intervāli un tās aprēķinā izmantotā pielāgotā modeļa grafika,

— paskaidrojums par atkāpēm no šīs testa metodes.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 60. 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. p. 26.

(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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 807–821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, p. 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. p. 36.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096–1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 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, p. 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, p. 81.

(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, p. 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 ó an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: p. 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, p. 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, p. 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, p. 280.

(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, p. 1–58.

1.A tabula

Testēšanai ieteicamās zivju sugas

SALDŪDENS
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele (9) (16)
Danio rerio Zebras zivs (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Karpa (8) (19)
Oryzias latipes Rīsa zivs/medaka (20) (21)
Pimephales promelas Resngalvas mailīte (8) (22)

▼B

1.B tabula

Citu labi dokumentētu sugu piemēri, ko var izmantot

SALDŪDENS	SĀLSŪDENS
Carassius auratus Sudrabainā karūsa (8)	*Menidia peninsulae* Alterīnveidīgo zivju suga (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Asarveidīgo zivju suga (8)	*Clupea harengus* Atlantijas siļķe (24) (25)
	Gadus morhua Menca (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Karpzobveidīgo zivju suga (23) (24) (25)

▼B

1. PAPILDINĀJUMS

NORĀDĪJUMI PAR TOKSICITĀTES TESTA IZDARĪŠANU AR ZEBRAS ZIVS (*Brachydanio rerio*) EMBRIJIEM UN MAZUĻIEM DZELTENUMMAISA ATTĪSTĪBAS STADIJĀ

IEVADS

Zebras zivs izcelsme ir Indijas Koromandelas piekrastē, kur tā dzīvo strauji tekošās straumēs. Tā ir parasta karpu dzimtas akvārija zivs, un informācija par tās kopšanu un audzēšanu ir atrodama standarta rokasgrāmatās par tropu zivīm. Tās bioloģiju un izmantošanu ar zvejniecību saistītos pētījumos ir apskatījis Lāle (1).

Šī zivs reti ir garāka par 45 mm. Ķermenis ir cilindrisks ar 7–9 tumši zilām horizontālām sudrabotām svītrām. Svītras iesniedzas astes spurā un anālajā spurā. Mugura ir olīvzaļa. Tēviņi ir slaidāki par mātītēm. Mātītes ir sudrabainākas, un vēderiņš ir izpleties, jo īpaši pirms nārstošanas.

Pieaugušas zivis spēj paciest lielas ūdens temperatūras, pH un cietības svārstības. Tomēr, lai iegūtu veselīgas zivis, kas rada labas kvalitātes oliņas, jānodrošina optimāli apstākļi.

Nārsta laikā tēviņš seko mātītei un to grūsta ar galvu un, kad oliņas ir izstumtas, tās apaugļo. Oliņas, kas ir caurspīdīgas un nelīpošas, nokrīt dibenā, kur tās var apēst vecāki. Nārstošanu ietekmē apgaismojums. Ja rīta gaisma ir atbilstoša, zivs parasti nārsto agrīnās stundās pēc rītausmas.

Mātīte var radīt vairāku simtu oliņu partijas nedēļas intervālos.

VAISLAS ZIVJU VAIROŠANĀS UN DZĪVES SĀKUMSTADIJU APSTĀKĻI

Izvēlas piemērotu skaitu veselu zivju un tās tur piemērotā ūdenī (skatīt, piemēram, 4. papildinājumu) vismaz divas nedēļas pirms paredzētā nārsta. Zivju grupai jāļauj vairoties vismaz vienu reizi pirms oliņu partijas veidošanas, ko izmanto testā. Zivju blīvums minētajā laika posmā nedrīkstētu pārsniegt 1 gramu zivju litrā. Regulāra ūdens maiņa vai tīrīšanas sistēmu izmantošana ļauj blīvumu palielināt. Temperatūrai turēšanas tvertnēs jābūt 25 ± 2 °C. Zivīm jānodrošina dažāda barība, kas var sastāvēt, piemēram, no atbilstošas pārdodamas sausās barības, dzīviem, tikko noķertiem bezčaulvēžiem, trīsuļodiem, dafnijām, sīksliekām (*Enchytraeids*).

Turpmāk ir galvenajos vilcienos aprakstītas divas procedūras, kas praksē ir ļāvušas iegūt pietiekami lielu partiju veselīgu apaugļotu oliņu veicamajam testam:

Astoņas mātītes un 16 tēviņus ievieto tvertnē, kas satur 50 litrus atšķaidīšanas ūdens un kas aizsargāta no tiešas gaismas, un atstāj, iespējami maz traucējot, vismaz 48 stundas. Pēcpusdienā pirms testa sākšanas akvārija dibenā novieto nārstošanas paplāti. Nārstošanas paplāte sastāv no 5–7 cm augsta rāmja (organiskā stikla vai cita piemērota materiāla), kam virspusē piestiprināts rupjš tīkls ar 2–5 mm acīm, bet apakšā smalks tīkls ar 10–30 μm acīm. Rāmja rupjajam tīklam ir piestiprināta rinda "nārsta koku", kas sastāv no nešķetinātām neilona auklām. Pēc tam, kad zivis ir atstātas tumsā 12 stundas, ieslēdz vāju apgaismojumu, kurš ierosina nārstošanu. Divas līdz četras stundas pēc nārstošanas paplāti izņem un oliņas savāc. Nārstošanas paplāte neļauj oliņas apēst zivīm un vienlaikus ļauj viegli savākt oliņas. Zivju grupai jābūt nārstojušai vismaz vienreiz pirms nārsta, no kura oliņas izmanto testā.

▼B

5–10 zivju tēviņus un mātītes tur atsevišķi vismaz divas nedēļas pirms paredzētā nārsta. Pēc 5–10 dienām mātīšu vēderiņi izstiepsies un kļūs redzamas ģenitālās kārpiņas. Zivju tēviņiem kārpiņu nav. Nārstošanu izdara nārstošanas tvertnēs, kas aprīkotas ar neīstu tīkla dibenu (kā aprakstīts iepriekš). Tvertne ir piepildīta ar atšķaidīšanas ūdeni tā, lai ūdens līmenis virs tīkla būtu 5–10 cm. Dienu pirms paredzētā nārsta vienu mātīti un divus tēviņus ievieto tvertnē. Ūdens temperatūru pakāpeniski paceļ vienu grādu augstāk par aklimatizācijas temperatūru. Gaismu izslēdz un tvertni atstāj cik iespējams netraucējot. No rīta ieslēdz vāju apgaismojumu, kas ierosina nārstošanu. Pēc 2–4 stundām zivis izņem un savāc oliņas. Ja vajadzīgas lielākas oliņu partijas, nekā var iegūt no vienas mātītes, tad paralēli var iekārtot pietiekami lielu nārstošanas tvertņu skaitu. Ja protokolē atsevišķu mātīšu vairošanās rezultātus pirms testa (partijas lielumu un kvalitāti), tad pavairošanai var izvēlēties mātītes ar labākajiem vairošanās rezultātiem.

Oliņas jāpārvieto testa traukos, izmantojot stikla caurulītes (iekšējais diametrs nav mazāks par 4 mm), kas aprīkotas ar lokanu sūkšanas baloniņu. Ūdens daudzumam, kas ir kopā ar oliņām, tās pārvietojot, jābūt iespējami mazam. Oliņas ir smagākas par ūdeni, un tās izplūst no caurulītes. Jāpievērš vērība, lai oliņas (un kāpuri) nesaskartos ar gaisu. Jāizdara partijas(-u) parauga(-u) apskate mikroskopā, lai pārliecinātos, ka pirmās attīstības stadijas norit normāli. Oliņu dezinfekcija nav atļauta.

Oliņu visaugstākā mirstība ir 24 pirmajās stundās pēc apaugļošanas. Minētajā laika posmā bieži ir novērojama 5–40 % mirstība. Oliņas deģenerējas neveiksmīgas apaugļošanas vai attīstības traucējumu dēļ. Šķiet, ka oliņu partijas kvalitāte ir atkarīga no mātītes, jo dažas mātītes pastāvīgi rada labas kvalitātes oliņas, bet citas nekad nerada. Arī attīstības un šķilšanās ātrums mainās no vienas partijas uz citu. Veiksmīgi apaugļotas oliņas un kāpuri dzeltenummaisa stadijā izdzīvo labi, parasti ap 90 %. 25 ^{o}C temperatūrā oliņas izšķilsies 3–5 dienas pēc apaugļošanas un dzeltenummaiss uzsūksies aptuveni 13 dienas pēc apaugļošanas.

Embrionālo attīstību labi ir raksturojis Hisaoka un Betls (2). Oliņu un izšķīlušos kāpuru caurspīdīguma dēļ var sekot zivju attīstībai un konstatēt attīstības defektus. Aptuveni četras stundas pēc nārsta neapaugļotās oliņas var atšķirt no apaugļotajām (3). Lai izdarītu šo apskati, oliņas un kāpurus ievieto maza tilpuma testa traukos un aplūko mikroskopā.

Testa apstākļi, kas izmantojami attīstības sākumstadijās, ir uzskaitīti 2. papildinājumā. Optimālie pH un atšķaidīšanas ūdens cietības lielumi attiecīgi ir 7,8 un 250 mg $CaCO_3$/l.

APRĒĶINI UN STATISTIKA

Tiek piedāvāta divpakāpju pieeja. Vispirms statistiski analizē datus par mirstību, anomālu attīstību un izšķilšanās laiku. Pēc tam koncentrācijām, kurās nav konstatēta negatīva ietekme uz kādu no minētajiem parametriem, statistiski novērtē ķermeņa garumu. Šī pieeja ir ieteicama, jo toksiskā viela var selektīvi nogalināt mazākas zivis, aizkavēt šķilšanās laiku un izraisīt attīstības defektus, tā radot neobjektīvus garuma mērījumus. Turklāt būs aptuveni tas pats mērāmo zivju skaits uz vienu apstrādi, kas nodrošinās testa statistisko derīgumu.

▼B

LC_{50} UN EC_{50} NOTEIKŠANA

Tiek piedāvāta divpakāpju pieeja. Vispirms statistiski uz kontroles mēģinājuma mirstību saskaņā ar Ebota formulu (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

kur:

P = koriģētais izdzīvotības %,

P' = testa koncentrācijā novērotais izdzīvotības %,

C = izdzīvotības % kontroles mēģinājumā.

Ja iespējams, LC_{50} ar piemērotu metodi nosaka testa beigās.

Ja ir vēlams EC_{50} statistikā iekļaut morfoloģiskās anomālijas, norādījumus skatīt (5).

LOEC UN NOEC NOVĒRTĒŠANA

Oliņu un dzeltenummaisa stadijas testa mērķis ir salīdzināt koncentrācijas, kas nav nulles koncentrācijas, ar kontroli, t. i., noteikt *LOEC*. Tādēļ būtu jāizmanto vairākkārtīgas salīdzināšanas procedūras (6) (7) (8) (9) (10).

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 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, p. 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrab rbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173–181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 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, p. 1096–1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 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, p. 103–117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 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.

2. PAPILDINĀJUMS

TESTA APSTĀKĻI, ILGUMS UN IZDZĪVOTĪBAS KRITĒRIJI IETEICAMAJĀM SUGĀM

Sugas	Temperatūra (°C)	Sāļums (0/00)	Fotoperiods (stundas)	Stadiju ilgums (dienas)		Parastais testa ilgums	Kontroles grupas izdzīvotība (minimālie %)	
				embrija	dzeltenummaisa		izšķilšanās rezultāts	pēc izšķilšanās
SALDŪDENS								
Brachydanio rerio Zebras zivs	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 5 dienām pēc izšķilšanās (8–10 dienas)	80	90
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 20 dienām pēc izšķilšanās (50–55 dienas)	66	70
Cyprinus carpio Karpa	21–25	—	12–16	5	> 4	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 4 dienām pēc izšķilšanās (8–9 dienas)	80	75
Oryzias latipes Rīsa zivs/medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 5 dienām pēc izšķilšanās (13–16 dienas)	80	80
Pimephales promelas Resngalvas mailīte	25 ± 2	—	16	4–5	5	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 4 dienām pēc izšķilšanās (8–9 dienas)	60	70

(1) Embrijiem.
(2) Kāpuriem.
(a) Tumsa embrijiem un kāpuriem līdz vienai nedēļai pēc izšķilšanās, izņemot laiku, kad tos apskata. Pēc tam vājš apgaismojums visā testa laikā.

02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 1736

3. PAPILDINĀJUMS

Testa apstākļi, ilgums un izdzīvotības kritēriji citām labi dokumentētām sugām

SUGAS	TEMPERATŪRA (°C)	SĀĻUMS (0/00)	FOTOPERIODS (stundas)	STADIJU ILGUMS (dienas)		PARASTAIS TESTA ILGUMS EMBRIJIEM UN DZELTENUMMAISAM	KONTROLES GRUPAS IZDZĪVOTĪBA (minimālie %)	
				embrija	dzeltenummaisa		izšķilšanās rezultāts	pēc izšķilšanās
SALDŪDENS								
Carassius auratus Sudrabainā karūsa	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 4 dienām pēc izšķilšanās (7 dienas)	—	80
Leopomis macrochirus Asarveidīgo zivju suga	21 ± 1	—	16	3	> 4	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 4 dienām pēc izšķilšanās (7 dienas)	—	75
SĀĻŪDENS								
Menidia peninsulae Ateriņveidīgo zivju suga	22–25	15–22	12	1,5	10	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 5 dienām pēc izšķilšanās (6–7 dienas)	80	60
Clupea harengus Atlantijas siļķe	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 3 dienām pēc izšķilšanās (23–27 dienas)	60	80
Gadus morhua Menca	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 3 dienām pēc izšķilšanās (18 dienas)	60	80
Cyprinodon variegatus Karpzobveidīgo zivju suga	25 ± 1	15–30	12	—	—	Iespējami drīz pēc apaugļošanas (gastrulas stadijas sākumā) līdz 4/7 dienām pēc izšķilšanās (28 dienas)	> 75	80

▼B

4. PAPILDINĀJUMS

PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS DAŽAS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

VIELA	KONCENTRĀCIJAS
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikumu hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

▼B

C.16. **MĀJAS BITES – AKŪTAS ORĀLĀS TOKSICITĀTES TESTS**

1. **METODE**

Šis akūtās toksicitātes tests ir ESAO TG 213 (1998) kopija.

1.1. IEVADS

Šis toksicitātes tests ir laboratorijas metode, kas paredzēta augu aizsardzības līdzekļu un citu ķimikāliju orālās akūtās toksicitātes novērtēšanai pieaugušām darba mājas bitēm.

Vielu toksisko īpašību pārbaudei un novērtēšanai var būt vajadzīga akūtās orālās toksicitātes noteikšana mājas bitēm, piemēram, ja ir sagaidāma attiecīgās ķimikālijas iedarbība uz bitēm. Akūtās orālās toksicitātes testu izdara, lai noteiktu pesticīdu un citu ķimikāliju raksturīgo toksicitāti bitēm. Šā testa rezultāti būtu jāizmanto, lai noskaidrotu turpmākas izvērtēšanas vajadzību. Jo īpaši šo metodi var izmantot pakāpeniskās programmās, lai novērtētu pesticīdu apdraudējumu bitēm, pamatojoties uz secīgu virzību no toksicitātes testiem laboratorijā uz eksperimentiem daļējos lauka apstākļos un lauka apstākļos (1). Pesticīdus var testēt kā aktīvās vielas (a.v.) vai kā preparātus.

Lai pārbaudītu bišu jutību un testa procedūras precizitāti, jālieto toksicitātes standarts.

1.2. DEFINĪCIJAS

Akūtā orālā toksicitāte: negatīvās ietekmes, kas rodas, ilgākais, 96 stundu (h) laika posmā pēc testa vielas vienas devas perorālas ievadīšanas.

Deva: testa vielas patērētais daudzums. Devu izsaka kā testa vielas masu (μg) uz testa dzīvnieku (μg uz biti). Reālo devu katrai bitei nevar aprēķināt, jo bites baro kolektīvi, bet vidējo devu var novērtēt (kopā patērētā testa viela/testa bišu skaits vienā sprostā).

LD_{50} (vidējā letālā deva), orālā: a statistiski aprēķināta vienreizēja vielas deva, kas, perorāli ievadot, var izraisīt 50 % dzīvnieku nāvi. LD_{50} lielumu izsaka testa vielas μg uz biti. Pesticīdiem testa viela var būt aktīvā viela (a.v.) vai preparāts, kas satur vienu vai vairākas aktīvās vielas.

Mirstība: dzīvnieku reģistrē kā mirušu, ja tas ir pilnīgi nekustīgs.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Pieaugušas darba mājas bites (*Apis mellifera*) pakļauj saharozes šķīdumā disperģētas testa vielas devām noteiktā diapazonā. Pēc tam bites baro ar to pašu barību, kurā testa vielas nav. Mirstību protokolē reizi dienā vismaz 48 stundu laikā un salīdzina ar kontroles lielumiem. Ja mirstība starp 24. stundu un 48. stundu palielinās, bet kontroles grupā mirstība paliek pieņemamā līmenī, t. i., $\leq$ 10 %, ir lietderīgi pagarināt testa ilgumu maksimāli līdz 96 stundām. Rezultātus analizē, lai aprēķinātu LD_{50} 24 stundās un 48 stundās un, ja pētījumu pagarina, 72 stundās un 96 stundās.

▼B

1.4. TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— kontroles mēģinājuma kopējā dzīvnieku skaita vidējā mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 %,

— toksicitātes standarta LD_{50} iekļaujas noteiktajā diapazonā.

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Bišu savākšana**

Būtu jāizmanto jaunas, pieaugušas vienas rases darba bites, t. i., viena vecuma, vienāda barojuma utt. bites. Bites būtu jāiegūst no atbilstīgi barotas, veselīgas, iespējami brīvas no slimībām saimes, kurā ir bišu māte un kuras vēsture un fizioloģiskais stāvoklis ir zināms. Bites var savākt izmantošanas rītā vai pirmstesta vakarā un turēt testa apstākļos līdz nākamai dienai. Bites, kas savāktas no rāmīšiem bez periem, ir piemērotas. Būtu jāizvairās bites vākt agrā pavasarī vai vēlā rudenī, jo tajā laikā bišu fizioloģija ir mainījusies. Ja testi ir jāizdara agrā pavasarī vai vēlā rudenī, bites var izperināt inkubatorā un vienu nedēļu audzēt ar "bišu maizi" (ziedputekšņiem, kas savākti no kārēm) un saharozes šķīdumu. Bites, kas apstrādātas ar ķīmiskām vielām, piemēram, antibiotikām, pretvarozes preparātiem utt., nedrīkstētu izmantot toksicitātes testā četras nedēļas pēc pēdējās apstrādes beigām.

1.5.2. **Turēšanas un barošanas apstākļi**

Izmanto viegli tīrāmus un labi vēdināmus sprostus. Var izmantot jebkuru piemērotu materiālu, piemēram, nerūsējošo tēraudu, stiepļu sietu, plastmasas vai iznīcināmus koka sprostus utt. Vēlamas ir grupas pa 10 bitēm sprostā. Testa sprostu lielums būtu jāpiemēro bišu skaitam, t. i., jānodrošina pietiekami daudz vietas.

Bites eksperimenta telpā būtu jātur tumsā 25 ± 2 °C temperatūrā. Visā testa laikā būtu jāprotokolē relatīvais mitrums, normāli tas ir ap 50–70 %. Darbības ar bitēm, iekļaujot apstrādi un novērošanu, var izdarīt (dienas) gaismā. Barībai izmanto saharozes šķīdumu ūdenī ar galīgo koncentrāciju 500 g/l (50 % svars/tilpums). Pēc testa devu iedošanas barība būtu jāsniedz *ad libitum*. Barošanas sistēmai būtu jārada iespēja protokolēt barības patēriņu katrā sprostā (skatīt 1.6.3.1. pantu). Var izmantot stikla caurulīti (aptuveni 50 mm garu un 10 mm platu, kam vaļējais gals sašaurināts līdz apmēram 2 mm diametram).

1.5.3. **Bišu sagatavošana**

Savāktās bites pēc nejaušās izvēles izvieto testa sprostos, ko pēc nejaušās izvēles novieto eksperimenta telpā.

▼B

Pirms testa uzsākšanas bitēm var nedot barību līdz divām stundām. Ir ieteicams pirms vielas došanas bitēm nedot barību, lai testa sākumā visas bites būtu vienādas zarnu satura ziņā. Mirstošas bites pirms testa uzsākšanas būtu jābrāķē un jāaizstāj ar veselām.

1.5.4. **Devu sagatavošana**

Ja testa viela jaucas ar ūdeni, to var tieši izšķīdināt 50 % saharozes šķīdumā. Tehniskiem produktiem un vielām, kas slikti šķīst ūdenī, var izmanto tādus nesējus kā organisks šķīdinātājs, emulgatori vai disperģējošas vielas, kas ir maz toksiskas bitēm (piemēram, acetonu, dimetilformamīdu, dimetilsulfoksīdu). Nesēja koncentrācija ir atkarīga no testa vielas šķīdības, un palīglīdzekļa koncentrācijai jābūt vienādai visās testa koncentrācijās. Tomēr piemērota nesēja koncentrācija parasti ir 1 %, un to nedrīkstētu pārsniegt.

Jāpagatavo attiecīgi kontroles šķīdumi, t. i., ja testa vielas šķīdināšanai lieto šķīdinātāju vai disperģējošu vielu, jāizmanto divas atsevišķas kontroles šķīdumu grupas: šķīdums ūdenī un saharozes šķīdums ar šķīdinātāju/nesēju tādā pašā koncentrācijā kā testa šķīdumos.

1.6. PROCEDŪRA

1.6.1. **Testa un kontroles grupas**

Testēto devu un paralēlo mēģinājumu skaitam jāatbilst statistikas prasībām, lai noteiktu LD_{50} ar 95 % ticamības robežu. Parasti testam ir vajadzīgas piecas devas ģeometriskā rindā ar koeficientu, ne lielāku par 2,2, rindā iekļaujot LD_{50}. Tomēr atšķaidīšanas koeficients un koncentrāciju skaits dozēšanai ir jānosaka attiecībā pret toksicitātes līknes slīpumu (deva pret mirstību) un jāņem vērā statistiskā metode, kas ir izraudzīta rezultātu analīzei. Izraudzīties dozēšanai piemērotas koncentrācijas var, izmantojot diapazona atrašanas testu.

Katra testa koncentrācija jādod vismaz trim paralēlām testa grupām ar 10 bitēm katrā grupā. Papildus testa rindām jāizdara mēģinājumi vismaz ar trim kontroles partijām pa 10 bitēm katrā. Kontroles partijas jāiekļauj arī lietotajiem šķīdinātājiem/nesējiem (skatīt 1.5.4. punktu).

1.6.2. **Toksicitātes standarts**

Testa rindā jāiekļauj toksicitātes standarts. Jāizvēlas vismaz trīs devas, iekļaujot sagaidāmo LD_{50} lielumu. Katrai testa devai jāizmanto vismaz trīs paralēlo mēģinājumu sprosti, katrs ar 10 bitēm. Vēlamais toksicitātes standarts ir dimetoāts, kuram protokolētā orālā LD_{50} – 24 h ir diapazonā 0,10–0,35 μg a.v. uz biti (2). Tomēr ir pieņemami citi toksicitātes standarti, ja pastāv pietiekams daudzums datu, lai pārbaudītu sagaidāmo devas/atbildes reakcijas sakarību (piemēram, parations).

▼B

1.6.3. **Pakļaušana iedarbībai**

1.6.3.1. *Devu ievadīšana*

Katrai testa bišu grupai jādod 100–200 µl 50 % saharozes šķīduma ūdenī, kas satur testa vielu attiecīgā koncentrācijā. Maz šķīstoši, maz toksiski izstrādājumi vai tādi, kas preparātā ir nelielā koncentrācijā, ir jādod lielākā tilpumā, jo ir jālieto lielāka daļa saharozes šķīduma. Apstrādātās barības daudzums, ko grupa patērējusi, pastāvīgi jāprotokolē. Pēc patērēšanas (parasti pēc 3–4 stundām) barošanas ierīce no sprosta jāaizvāc un jāaizstāj ar tādu, kas satur tikai saharozes šķīdumu. Saharozes šķīdumu pēc tam dod *ad libitum*. Dažu savienojumu gadījumā bites var atteikties no testa devas lielākām koncentrācijām, barību patērējot maz vai vispār nepatērējot. Vēlākais pēc sešām stundām nepatērētā apstrādātā barība jāaizstāj ar tīru saharozes šķīdumu. Patērētais apstrādātās barības daudzums jānovērtē (piemēram, izmērot palikušās apstrādātās barības tilpumu/svaru).

1.6.3.2. *Ilgums*

Vēlamais testa ilgums ir 48 stundas pēc testa šķīduma aizstāšanas ar tīru saharozes šķīdumu. Ja mirstība pēc pirmajām 24 stundām turpina palielināties vairāk nekā par 10 %, testa ilgums jāpagarina, ilgākais, līdz 96 stundām ar nosacījumu, ka kontroles grupas mirstība nepārsniedz 10 %.

1.6.4. **Novērojumi**

Mirstību protokolē četras stundas pēc testa sākuma un pēc tam pēc 24 un 48 stundām (t. i., pēc devas došanas). Ja ir vajadzīgs pagarināts novērošanas laika posms, turpmāki novērtējumi jāizdara 24 stundu intervālos ilgākais līdz 96 stundām ar nosacījumu, ka kontroles grupā mirstība nepārsniedz 10 %.

Jānovērtē grupas patērētās barības daudzums. Apstrādātās un neapstrādātās barības patēriņa salīdzinājums sešu stundu laikā var sniegt informāciju par apstrādātās barības garšīgumu.

Testa laikā novērota anomāla izturēšanās būtu jāprotokolē.

1.6.5. **Pieļaujamā daudzuma tests**

Dažos gadījumos (piemēram, ja ir sagaidāms, ka testa vielai būs neliela toksicitāte) var izdarīt pieļaujamā daudzuma testu, izmantojot 100 µg a.v. uz biti, lai parādītu, ka LD_{50} pārsniedz šo lielumu. Jāizmanto tā pati procedūra, iekļaujot trīs paralēlu testu grupas uz testa devu, attiecīgu kontroles mēģinājumu, patērētās apstrādātās barības daudzuma novērtēšanu un toksicitātes standarta izmantošanu. Ja mirstība parādās, jāizdara pilns pētījums. Ja novēro subletālas ietekmes (skatīt 1.6.4. punktu), tās jāprotokolē.

▼B

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

2.1. DATI

Dati jāapkopo tabulā, katrai apstrādātai grupai, kā arī kontroles un toksicitātes standarta grupām parādot izmantoto bišu skaitu, mirstību katrā novērojumu izdarīšanas brīdī un bišu skaitu ar anomālu izturēšanos. Mirstības datus analizē ar piemērotām statistiskajām metodēm (piemēram, varbūtības vienību analīzi, slīdošo vidējo, binomiālo varbūtību) (3) (4). Grafiski atliek devas/atbildes reakcijas līknes katrā ieteicamajā novērojumu izdarīšanas brīdī un aprēķina līkņu slīpumus un vidējo letālo devu (LD_{50}) ar 95 % ticamības robežu. Korekcijas uz kontroles grupas mirstību var izdarīt, izmantojot Ebota korekciju (4) (5). Ja apstrādātā barība nav pilnībā patērēta, jānosaka uz grupu patērētā testa vielas deva. LD_{50} jāizsaka testa vielas mikrogramos uz biti.

2.2. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

2.2.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, stabilitāte ūdenī, tvaika spiediens),

— ķīmiskās identifikācijas dati, iekļaujot struktūrformulu, tīrību (t. i., pesticīdiem aktīvās(-o) vielas(-u) identitāti un koncentrāciju(-as)).

2.2.2. **Testa suga:**

— zinātniskais nosaukums, rase, aptuvens vecums (nedēļās), savākšanas metode, savākšanas datums,

— informācija par testa bišu savākšanai izmantotajām kolonijām, iekļaujot veselību, pieaugušo bišu slimības, iepriekšējo apstrādi utt.

2.2.3. **Testa apstākļi:**

— eksperimenta telpas temperatūra un relatīvais mitrums,

— turēšanas apstākļi, iekļaujot sprostu tipu, lielumu un materiālu,

— izejas šķīduma un testa šķīdumu pagatavošanas metode (ir jānorāda šķīdinātājs, ja to lieto, un tā koncentrācija),

— testa plāns, piemēram, izmantoto testa šķīdumu skaits un koncentrācijas, kontroles mēģinājumu skaits; katrai testa koncentrācijai un kontrolei – paralēlo mēģinājumu sprostu skaits un bišu skaits uz sprostu,

— testa datums.

▼B

2.2.4. **Rezultāti:**

— diapazona atrašanas priekšmēģinājuma rezultāti, ja tas izdarīts,

— izejas dati: mirstība pie katras testētās devas katrā novērojumu izdarīšanas brīdī,

— devas/atbildes reakcijas līknes grafiks testa beigās,

— LD_{50} lielumi ar 95 % ticamības robežu katrā no ieteicamajiem novērojumu izdarīšanas brīžiem testa vielai un toksicitātes standartam,

— statistiskās procedūras, kas izmantotas LD_{50} noteikšanai,

— mirstība kontroles mēģinājumos,

— citas novērotas vai izmērītas bioloģiskās ietekmes, piemēram, anomāla bišu izturēšanās (iekļaujot atteikšanos no testa devas), patērētās barības daudzums apstrādātās un neapstrādātās grupās,

— novirzes no šeit aprakstītās testa procedūras un cita būtiska informācija.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 151–165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, 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, p. 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, p. 265–267.

▼B

C.17. MĀJAS BITES – AKŪTAS KONTAKTA TOKSICITĀTES TESTS

1. METODE

Šī akūtās toksicitātes testa metode ir ESAO TG 214 (1998) kopija.

1.1. IEVADS

Šis toksicitātes tests ir laboratorijas metode, kas paredzēta, lai novērtētu augu aizsardzības līdzekļu un citu ķimikāliju akūto kontakta toksicitāti pieaugušām darba bitēm.

Vielu toksisko īpašību pārbaudei un novērtēšanai var būt vajadzīga akūtās kontakta toksicitātes noteikšana mājas bitēm, piemēram, ja ir sagaidāma attiecīgās ķimikālijas iedarbība uz bitēm. Akūtās kontakta toksicitātes testu izdara, lai noteiktu pesticīdiem un citām ķimikālijām piemītošo toksicitāti bitēm. Šā testa rezultāti būtu jāizmanto, lai noskaidrotu, vai ir vajadzīga turpmāka izvērtēšana. Jo īpaši šo metodi var izmantot pakāpeniskās programmās, lai novērtētu pesticīdu apdraudējumu bitēm, pamatojoties uz secīgu virzību no toksicitātes testiem laboratorijā uz eksperimentiem daļējos lauka apstākļos un lauka apstākļos (1). Pesticīdus var testēt kā aktīvās vielas (a.v.) vai kā preparātus.

Lai pārbaudītu bišu jutību un testa procedūras precizitāti, jālieto toksicitātes standarts.

1.2. DEFINĪCIJAS

Akūta orālā toksicitāte: negatīvās ietekmes, kas rodas, ilgākais, 96 stundu laika posmā pēc testa vielas vienas devas lokālas pielietošanas.

Deva: testa vielas lietotais daudzums. Devu izsaka kā testa vielas masu (µg) uz testa dzīvnieku (µg uz biti).

LD_{50} (vidējā letālā deva), kontakta: statistiski aprēķināta vienreizēja vielas deva, kas, kontakta ceļā ievadot, var izraisīt 50 % dzīvnieku nāvi. LD_{50} lielumu izsaka testa vielas µg uz biti. Pesticīdiem testa viela var būt aktīvā viela (a.v.) vai preparāts, kas satur vienu vai vairākas aktīvās vielas.

Mirstība: dzīvnieku protokolē kā mirušu, ja tas ir pilnīgi nekustīgs.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Pieaugušas darba mājas bites (*Apis mellifera*) pakļauj piemērotā nesējā izšķīdinātas testa vielas iedarbībai, tieši pielietojot uz torakālās daļas (pilieniņu veidā). Testa ilgums ir 48 stundas. Ja mirstība palielinās starp 24 stundām un 48 stundām, bet kontroles mēģinājumā mirstība saglabājas pieņemamā līmenī, t. i., $\leq$ 10 %, ir lietderīgi paildzināt testu maksimāli līdz 96 stundām. Mirstību protokolē ik dienas un salīdzina ar lielumiem kontroles mēģinājumā. Rezultātus analizē, lai aprēķinātu LD_{50} pēc 24 stundām un pēc 48 stundām un paildzināta pētījuma gadījumā pēc 72 stundām un 96 stundām.

▼B

1.4. TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— kontroles mēģinājuma kopējā dzīvnieku skaita vidējā mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 %,

— toksicitātes standarta LD_{50} iekļaujas noteiktajā diapazonā.

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Bišu savākšana**

Jāizmanto jaunas, pieaugušas darba bites, t. i., viena vecuma, vienāda barojuma, vienas rases utt. bites. Bites jāiegūst no atbilstīgi barotas, veselīgas, iespējami brīvas no slimībām saimes, kurā ir bišu māte un kuras vēsture un fizioloģiskais stāvoklis ir zināms. Bites var savākt izmantošanas rītā vai pirmstesta vakarā un turēt testa apstākļos līdz nākamajai dienai. Bites, kas savāktas no rāmīšiem bez periem, ir piemērotas. Jāizvairās bites vākt agrā pavasarī vai vēlā rudenī, jo tajā laika posmā bišu fizioloģija ir mainījusies. Ja testi ir jāizdara agrā pavasarī vai vēlā rudenī, bites var izperināt inkubatorā un vienu nedēļu audzēt ar "bišu maizi" (ziedputekšņiem, kas savākti no kārēm) un saharozes šķīdumu. Bites, kas apstrādātas ar ķīmiskām vielām, piemēram, antibiotikām, pretvarozes preparātiem utt., nedrīkst izmantot toksicitātes testā četras nedēļas pēc pēdējās apstrādes beigām.

1.5.2. **Turēšanas un barošanas apstākļi**

Izmanto viegli tīrāmus un labi vēdināmus sprostus. Var izmantot jebkuru piemērotu materiālu, piemēram, nerūsošo tēraudu, stiepļu sietu, plastmasu, iznīcināmus koka sprostus utt. Testa sprostiem būtu jābūt piemērotiem bišu skaitam, t.i., jānodrošina pietiekami daudz vietas. Vēlamas ir grupas pa 10 bitēm sprostā.

Bites eksperimenta telpā jātur tumsā 25 ± 2 °C temperatūrā. Visā testa laikā jāprotokolē relatīvais mitrums, normāli tas ir ap 50–70 %. Darbības ar bitēm, iekļaujot apstrādi un novērošanu, var izdarīt (dienas) gaismā. Barībai izmanto saharozes šķīdumu ūdenī ar galīgo koncentrāciju 500 g/l (50 % svars/tilpums) un testa laikā to nodrošina *ad libitum*, izmantojot bišu barošanas ierīci. Tā var būt stikla caurulīte (aptuveni 50 mm gara un 10 mm plata, kuras vaļējais gals ir sašaurināts līdz apmēram 2 mm diametrā).

1.5.3. **Bišu sagatavošana**

Lai pielietotu testa vielu, savāktajām bitēm var izdarīt anestēziju ar oglekļa dioksīdu vai slāpekli. Anestēzijas līdzekļa daudzumam un iedarbības laikam jābūt iespējami mazam. Mirstošas bites pirms testa sākšanas jābrāķē un jāaizstāj ar veselām.

1.5.4. **Devu sagatavošana**

Testa viela ir jādod bitēm nesējā, t. i., organiskā šķīdinātājā vai ūdens šķīdumā ar mitrinošu vielu. Kā organisks šķīdinātājs ir vēlams acetons, bet var lietot arī citus organiskos šķīdinātājus, kas bitēm ir maztoksiski (piemēram, dimetilformamīdu, dimetilsulfoksīdu). Ūdenī disperģētu preparātu un organiskajos šķīdinātājos nesējos nešķīstošu ļoti polāru organisko vielu šķīdumus var būt vieglāk lietot, ja tie ir sagatavoti komerciāla mitrinoša preparāta (piemēram, *Agral*, *Citto-wett*, *Lubrol*, *Triton*, *Tween*) atšķaidītā šķīdumā.

▼B

Jāpagatavo attiecīgi kontroles šķīdumi, t. i., ja testa vielas šķīdināšanai lieto šķīdinātāju vai disperģējošu vielu, jāizmanto divas atsevišķas kontroles šķīdumu grupas, no kurām vienu apstrādā ar ūdeni un otru apstrādā ar šķīdinātāju/disperģētāju.

1.6. PROCEDŪRA

1.6.1. **Testa un kontroles grupas**

Testēto devu un paralēlo mēģinājumu skaitam jāatbilst statistikas prasībām, lai noteiktu LD_{50} ar 95 % ticamības robežu. Parasti testam ir vajadzīgas piecas devas ģeometriskā rindā ar koeficientu, ne lielāku par 2,2, iekļaujot LD_{50} diapazonu. Tomēr devu skaits ir jānosaka attiecībā pret toksicitātes līknes slīpumu (deva pret mirstību) un jāņem vērā statistiskā metode, kas ir izraudzīta rezultātu analīzei. Izraudzīties dozēšanai piemērotas koncentrācijas var, izmantojot diapazona atrašanas testu.

Katra testa koncentrācija jādod vismaz trim paralēlām testa grupām ar 10 bitēm katrā grupā.

Papildus testa rindām jāizdara mēģinājumi vismaz ar trim kontroles partijām pa 10 bitēm katrā. Ja lieto organisko šķīdinātāju vai mitrinošo vielu, ir jāiekļauj trīs papildu kontroles partijas pa 10 bitēm katrā – šķīdinātājam vai mitrinošajai vielai.

1.6.2. **Toksicitātes standarts**

Testa rindā ir jāiekļauj toksicitātes standarts. Jāizvēlas vismaz trīs devas, lai iekļautu sagaidāmo LD_{50} lielumu. Katrai testa devai jāizmanto vismaz trīs paralēlo mēģinājumu sprosti, no kuriem katrā ir 10 bites. Vēlamais toksicitātes standarts ir dimetoāts, kuram protokolētā kontakta LD_{50} – 24 h ir diapazonā 0,10–0,30 μg a.v. uz biti (2). Tomēr ir pieņemami citi toksicitātes standarti, ja pastāv pietiekams daudzums datu, lai pārbaudītu sagaidāmo devas sakarību ar atbildes reakciju (piemēram, parations).

1.6.3. **Pakļaušana iedarbībai**

1.6.3.1. *Devu ievadīšana*

Anestezētas bites apstrādā atsevišķi, vielu lietojot vietēji. Bitēm pēc nejaušās izvēles nozīmē dažādas testa devas un kontroli. Attiecīgas koncentrācijas šķīduma 1 μl ar mikroaplikatoru uzliek katras bites torakālās daļas muguras pusei. Ja tas ir pamatoti, var lietot citus tilpumus. Pēc šķīduma uzlikšanas bites ievieto testa sprostos un tām piegādā saharozes šķīdumus.

1.6.3.2. *Ilgums*

Vēlamais testa ilgums ir 48 stundas. Ja starp 24 stundām un 48 stundām mirstība palielinās vairāk nekā par 10 %, testa ilgums būtu jāpalielina līdz maksimāli 96 stundām ar nosacījumu, ka kontroles grupā mirstība nepārsniedz 10 %.

▼B

1.6.4. **Novērojumi**

Mirstību protokolē četras stundas pēc devas došanas un pēc tam 24 stundas un 48 stundas. Ja ir vajadzīgs pagarināts novērojumu laika posms, turpmāki novērtējumi jāizdara 24 stundu intervālos maksimāli līdz 96 stundām ar nosacījumu, ka kontroles grupā mirstība nav lielāka par 10 %.

Testa laikā novērota anomāla izturēšanās jāprotokolē.

1.6.5. **Pieļaujamā daudzuma tests**

Dažos gadījumos (piemēram, ja ir sagaidāms, ka testa vielai būs neliela toksicitāte) var izdarīt pieļaujamā daudzuma testu, izmantojot 100 µg a.v. uz biti, lai parādītu, ka LD_{50} pārsniedz šo lielumu. Jālieto tā pati procedūra, iekļaujot trīs paralēlas testa grupas testa devai, attiecīgo kontroles mēģinājumu un toksicitātes standartu. Ja mirstība parādās, jāizdara pilns pētījums. Ja novēro subletālas ietekmes (skatīt 1.6.4. punktu), tās jāprotokolē.

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

2.1. DATI

Dati jāapkopo tabulā, parādot katrai apstrādātai grupai, kā arī kontroles un toksicitātes standarta grupām izmantoto bišu skaitu, mirstību katrā novērojumu izdarīšanas brīdī un bišu skaitu ar anomālu izturēšanos. Mirstības datus analizē ar piemērotām statistikas metodēm (piemēram, varbūtības vienības analīzi, slīdošo vidējo, binomiālo varbūtību) (3) (4). Katram ieteicamajam novērojumu izdarīšanas brīdim (t. i., 24 stundas, 48 stundas un attiecīgā gadījumā 72 stundas, 96 stundas) grafiski atliek devas attiecības pret atbildes reakciju līknes un aprēķina līkņu slīpumus un vidējo letālo devu (LD_{50}) ar 95 % ticamības robežu. Korekcijas uz kontroles grupas mirstību var izdarīt, izmantojot Ebota korekciju (4) (5). LD_{50} jāizsaka testa vielas µg uz biti.

2.2. TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai.

2.2.1. **Testa viela:**

— fizikālais stāvoklis un fizikāli ķīmiskās īpašības (piemēram, stabilitāte ūdenī, tvaika spiediens),

— ķīmiskās identifikācijas dati, iekļaujot struktūrformulu, tīrību (t. i., pesticīdiem aktīvās(-o) vielas(-u) identitāti un koncentrāciju(-as)).

2.2.2. **Testa suga:**

— zinātniskais nosaukums, rase, aptuvens vecums (nedēļās), savākšanas metode, savākšanas datums,

— informācija par testa bišu savākšanai izmantotajām kolonijām, iekļaujot veselību, pieaugušo bišu slimības, iepriekšējo apstrādi utt.

▼B

2.2.3. **Testa apstākļi:**

— eksperimenta telpas temperatūra un relatīvais mitrums,

— turēšanas apstākļi, iekļaujot sprostu tipu, lielumu un materiālu,

— testa vielas lietošanas metodes, piemēram, lietotais nesējšķīdinātājs, bitei uzliktais testa šķīduma tilpums, lietotais anestēzijas līdzeklis,

— testa plāns, piemēram, izmantoto testa devu skaits un koncentrācijas, kontroles mēģinājumu skaits; katrai testa koncentrācijai un kontrolei paralēlo mēģinājumu sprostu skaits un bišu skaits sprostā,

— testa datums.

2.2.4. **Rezultāti:**

— diapazona atrašanas priekšmēģinājuma rezultāti, ja tas izdarīts,

— izejas dati: mirstība pie katras testētās koncentrācijas katrā novērojumu izdarīšanas brīdī,

— devas/atbildes reakcijas līknes grafika testa beigās,

— LD_{50} lielumi ar 95 % ticamības robežu katrā no ieteicamajiem novērojumu izdarīšanas brīžiem testa vielai un toksicitātes standartam,

— statistiskās procedūras, kas izmantotas LD_{50} noteikšanai,

— mirstība kontroles mēģinājumos,

— citas novērotas vai izmērītas bioloģiskas ietekmes un anomālas bišu atbildes reakcijas,

— novirzes no šeit aprakstītās testa procedūras un cita būtiska informācija.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, p. 151–165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, 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, p. 119–125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 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, p. 265–267.

▼B

C.18. **ADSORBCIJA/DESORBCIJA AR KRATĪŠANAS METODI**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO TG 106 kopija augsnes adsorbcijas/desorbcijas noteikšanai, izmantojot kratīšanas metodi (*Batch Equilibrium Method*) (2000).

1.1. IEVADS

Metode ņem vērā gredzena testu un semināru augsnes izvēlei adsorbcijas testa izveidei (1) (2) (3) (4) un arī esošās valsts līmeņa pamatnostādnes (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorbcijas/desorbcijas pētījumi ir noderīgi būtiskas informācijas iegūšanai par ķimikāliju kustīgumu un sadalījumu augsnē, ūdenī un biosfēras gaisa nodalījumos (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Informāciju var izmantot, piemēram, lai paredzētu vai novērtētu ķimikālijas pieejamību noārdīšanai (22) (23), pārveidošanai un uzņemšanai organismos (24); izsālīšanai cauri augsnes profilam (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); gaistamībai no augsnes (21) (29) (30); aizplūšanai no zemes virsmas dabiskajos ūdeņos (18) (31) (32). Adsorbcijas datus var izmantot salīdzināšanai un modelēšanai (19) (33) (34) (35).

Ķimikāliju sadalījuma veidošanās starp augsnes un ūdens fāzēm ir sarežģīts process, kas ir atkarīgs no vairākiem atšķirīgiem faktoriem: no vielas ķīmiskajām īpašībām (12) (36) (37) (38) (39) (40), augsnes īpašībām (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) un klimata faktoriem, piemēram, lietus, temperatūras, saules gaismas un vēja. Tādā kārtā daudzās parādības un mehānismi, kas ir iesaistīti ķimikālijas adsorbcijas procesos augsnē, nav pilnībā noskaidrojami ar vienkāršotu laboratorijas modeli, piemēram, ar šeit aprakstīto metodi. Tomēr, pat ja šo mēģinājumu nevar attiecināt uz visiem vidē iespējamiem gadījumiem, tas sniedz vērtīgu informāciju par vides saistību ar kādas ķimikālijas adsorbciju.

Skatīt arī vispārīgo ievadu.

1.2. DARBĪBAS JOMA

Metodes uzdevums ir noskaidrot vielas adsorbcijas/desorbcijas izturēšanos augsnē. Mērķis ir iegūt sorbcijas lielumu, ko varētu izmantot, lai paredzētu sadalījumu augsnē pie dažādiem vides apstākļiem; šajā nolūkā nosaka ķimikālijas līdzsvara adsorbcijas koeficientus dažādās augsnēs kā augsnes raksturlielumu (piemēram, organiskā oglekļa satura, mālu satura un augsnes struktūras un pH) funkciju. Lai iespējami plašāk ietvertu attiecīgās vielas savstarpējo iedarbību ar dabā sastopamajām augsnēm, ir jāizmanto dažādu tipu augsnes.

Šajā metodē adsorbcija ir ķimikālijas saistīšanās procesi ar augšņu virsmu; metode neatšķir dažādus adsorbcijas procesus (fizikālo un ķīmisko adsorbciju) un tādus procesus kā virsmas katalizēta noārdīšanās, adsorbcija tilpumā vai ķīmiskā reakcija. Adsorbciju, kas notiek uz augsnes veidotajām koloidālajām daļiņām (diametrs < 0,2 μm), neņem vērā.

▼B

Augsnes parametri, ko uzskata par adsorbcijai vissvarīgākajiem, ir: organiskā oglekļa saturs (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); mālu saturs un augsnes struktūra (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) un pH jonizējamiem savienojumiem (3) (4) (42). Citi augsnes parametri, kuri var ietekmēt konkrētas vielas adsorbciju/desorbciju, ir efektīvā katjonu apmaiņas spēja (EKAS), amorfo dzelzs un alumīnija oksīdu saturs, jo īpaši vulkāniskajās un tropu augsnēs, kā arī īpatnējā virsma (49).

Tests ir izstrādāts, lai novērtētu ķimikālijas adsorbciju uz dažādu tipu augsnēm ar dažādu organiskā oglekļa saturu, mālu saturu, augsnes struktūru un pH. Tas iekļauj trīs posmus.

1. **posms:** iepriekšēja izpēte, lai noteiktu:

   — augsnes/šķīduma attiecību,

   — adsorbcijas līdzsvara iestāšanās laiku un līdzsvara stāvoklī adsorbēto testa vielas daudzumu,

   — testa vielas adsorbciju uz testa trauku virsmām un testa vielas stabilitāti testa laikā.

2. **posms:** skrīninga tests – adsorbciju pēta pieciem dažādiem augsnes tipiem ar adsorbcijas kinētiku vienai koncentrācijai un nosaka sadalījuma koeficientu K_d un K_{oc}.

3. **posms:** Freindliha adsorbcijas izotermas noteikšana, lai noteiktu, kā koncentrācija ietekmē adsorbcijas pakāpi uz augsnēm.

   Desorbcijas pētījums ar desorbcijas kinētikas/Freindliha desorbcijas izotermas noteikšanu (1. papildinājums).

1.3. DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

Simbols	Definīcija	Vienības
A_{t_i}	adsorbcijas procentuālais daudzums laika punktā t_i	%
A_{eq}	adsorbcijas procentuālais daudzums adsorbcijas līdzsvara stāvoklī	%
$m_s^{ads}(t_i)$	uz augsnes adsorbētās testa vielas masa laika punktā t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	uz augsnes adsorbētās testa vielas masa laika intervālā Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	uz augsnes adsorbētās testa vielas masa adsorbcijas līdzsvara stāvoklī	µg
m_0	testa vielas masa mēģenē adsorbcijas testa sākumā	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	testa vielas masa alikvotā (v_a^A) laika punktā t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	vielas masa šķīdumā adsorbcijas līdzsvara stāvoklī	µg
m_{soil}	augsnes fāzes daudzums, izteikts kā augsnes sausā masa	g

▼B

Simbols	Definīcija	Vienības
C_{st}	vielas izejas šķīduma masas koncentrācija	μg cm^{-3}
C_0	testa šķīduma sākotnējā masas koncentrācija saskarē ar augsni	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	vielas masas koncentrācija ūdens fāzē laika punktā t_i, kad veic analīzi	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	uz augsnes adsorbētās vielas saturs adsorbcijas līdzsvara stāvoklī	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	vielas masas koncentrācija ūdens fāzē adsorbcijas līdzsvara stāvoklī	μg cm^{-3}
V_0	sākotnējais tilpums ūdens fāzei, kas adsorbcijas testa laikā saskaras ar augsni	cm^3
v_a^A	alikvota tilpums, kurā mēra testa vielu	cm^3
K_d	adsorbcijas sadalījuma koeficients	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	organiskā oglekļa normalizētais adsorbcijas koeficients	cm^3 g^{-1}
K_{om}	organiskās vielas normalizētais sadalījuma koeficients	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freindliha adsorbcijas koeficients	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freindliha pakāpes rādītājs	
D_{t_i}	desorbcijas procentuālais daudzums laika punktā t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorbcijas procentuālais daudzums laika intervālā Δt_i	%
K_{des}	šķietamais desorbcijas koeficients	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freindliha desorbcijas koeficients	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	no augsnes desorbētās testa vielas masa laika punktā t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	no augsnes desorbētās testa vielas masa laika intervālā Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	analītiski noteiktā vielas masa ūdens fāzē desorbcijas līdzsvara stāvoklī	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	testa vielas desorbētā kopējā masa līdzsvara stāvoklī	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	testa vielas masa, kas palikusi adsorbēta uz augsnes pēc laika intervāla Δt_i	μg
m_{aq}^A	vielas masa, kas nepilnīgas tilpuma aizvietošanas dēļ palikusi pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas	μg
$C_s^{des}(eq)$	testa vielas saturs, kas palikusi adsorbēta uz augsnes desorbcijas līdzsvara stāvoklī	μg g^{-1}

▼B

Simbols	Definīcija	Vienības
$C_{aq}^{des}(eq)$	testa vielas masas koncentrācija ūdens fāzē desorbcijas līdzsvara stāvoklī	μg cm^{-3}
V_T	tilpums ūdens fāzei, kas saskaras ar augsni desorbcijas kinētikas eksperimenta laikā, ko izdara ar virknes metodi	cm^3
V_R	supernatanta tilpums, kas aizvadīts no mēģenes pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas un aizvietots ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ tilpumu	cm^3
v_a^D	alikvota tilpums, kas desorbcijas eksperimenta laikā, kuru izdara ar virknes metodi, ņemts analīzei no laika punkta (i)	cm^3
V_r^i	Šķīduma tilpums, kas ņemts no mēģenes (i) testa vielas mērījumam desorbcijas kinētikas eksperimentā (paralēlā metode)	cm^3
V_r^F	šķīduma tilpums, kas ņemts no mēģenes testa vielas mērījumam desorbcijas līdzsvara stāvoklī	cm^3
MB	masas bilance	%
m_E	testa vielas kopējā masa, kas ekstrahēta no augsnes un no testa trauka sieniņām divos posmos	μg
V_{rec}	pēc adsorbcijas līdzsvara atgūtais supernatanta tilpums	cm^3
P_{ow}	sadalījuma koeficients sistēmā oktanols/ūdens	
pKa	disociācijas konstante	
S_w	šķīdība ūdenī	g l^{-1}

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Neiezīmētas vai radioaktīvi iezīmētas testa vielas šķīdumu 0,01 M kalcija hlorīdā zināmus tilpumus ar zināmām koncentrācijām pievieno augsnes paraugiem, kam ir zināma sausā masa un kas iepriekš ir sasnieguši līdzsvara stāvokli 0,01 M kalcija hlorīdā. Maisījumu atbilstīgu laiku krata. Augsnes suspensijas pēc tam atdala centrifugējot un, ja vēlas, filtrē un analizē ūdens fāzi. Uz augsnes parauga adsorbēto testa vielas daudzumu aprēķina kā starpību starp šķīdumā sākotnēji esošo testa vielas daudzumu un eksperimenta beigās palikušo daudzumu (netiešā metode).

Pēc izvēles adsorbēto testa vielas daudzumu var noteikt arī tiešā augsnes analīzē (tiešā metode). Pēdējā minētā procedūra, kas ietver ekstrakciju vairākos posmos ar atbilstīgu šķīdinātāju, ir ieteicama gadījumos, kad vielas šķīdumu koncentrāciju starpību nevar precīzi noteikt. Šādi gadījumi ir, piemēram: testa vielas adsorbcija uz testa trauku virsmas, testa vielas nestabilitāte eksperimenta laikā, vāja adsorbcija, kas noved tikai pie niecīgas šķīduma koncentrācijas maiņas; un stipra adsorbcija, kas noved pie mazas koncentrācijas, ko nevar precīzi noteikt. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu vielu, no augsnes ekstrahēšanas var izvairīties, pārpelnojot augsnes fāzi un analizējot ar šķidruma scintilācijas skaitītāju. Tomēr šķidruma scintilācijas skaitīšana ir nespecifiska metode, kas nevar atšķirt sākumproduktus un pārveidošanās produktus; tādēļ tā būtu jāizmanto tikai tad, ja testa ķimikālija ir stabila pētījuma laikā.

▼B

1.5. INFORMĀCIJA PAR TESTA VIELU

Reaktīviem jābūt analītiskas tīrības pakāpes. Ir ieteicams lietot neiezīmētās testa vielas ar zināmu uzbūvi un vēlams vismaz 95 % tīrību vai radioaktīvi iezīmētas testa vielas ar zināmu uzbūvi un radioaktīvi tīras. Marķiervielām ar īsu pussabrukšanas periodu jāpielieto korekcijas uz sabrukšanu.

Pirms adsorbcijas/desorbcijas testu izdarīšanas vajadzīga šāda informācija par testa vielu:

a) šķīdība ūdenī (A.6);

b) tvaika spiediens (A.4) vai Henrija likuma konstante;

c) abiotiska noārdīšanās: hidrolīze kā pH funkcija (C.7);

d) sadalījuma koeficients (A.8);

e) vieglā bionoārdīšanās (C.4), t. i., aerobā un anaerobā pārvēršanās augsnē;

f) jonizējamo vielu pKa;

g) tiešā fotolīze ūdenī (t. i., UV-Vis absorbcijas spektri ūdenī, kvantu iznākums) un fotonoārdīšanās uz augsnes.

1.6. TESTA PIEMĒROJAMĪBA

Tests ir piemērojams ķīmiskām vielām, kurām ir pieejama analītiska metode ar pietiekamu precizitāti. Svarīgs parametrs, kas var ietekmēt rezultātu ticamību, īpaši, ja rīkojas pēc netiešās metodes, ir testa vielas stabilitāte testa laika mērogā. Tāpēc priekšmēģinājumā ir obligāti jāpārbauda vielas stabilitāte; ja ir novērojama pārveidošanās testa laika mērogā, ir ieteicams galveno pētījumu veikt, analizējot gan augsnes, gan ūdens fāzes.

Grūtības var rasties, izdarot šo testu vielām ar mazu šķīdību ūdenī ($Sw < 10^{-4}$ g l^{-1}), kā arī stipri lādētām vielām, tādēļ, ka koncentrāciju ūdens fāzē nevar izmērīt ar pietiekamu analītisku precizitāti. Tādos gadījumos ir jāveic papildu pasākumi. Pamatnostādnes, kā rīkoties minēto problēmu gadījumā, ir dotas šīs metodes attiecīgās iedaļās.

Analizējot gaistošas vielas, ir jāpievērš uzmanība, lai izvairītos no zudumiem pētījuma laikā.

1.7. METODES APRAKSTS

1.7.1. **Aprīkojums un ķīmiskie reaģenti**

Laboratorijas standartaprīkojums, īpaši šāds:

a) mēģenes vai trauki eksperimentu veikšanai. Ir svarīgi, lai attiecīgās mēģenes vai trauki:

— precīzi atbilstu centrifūgai, lai samazinātu manipulāciju un pārneses kļūdas,

— būtu izgatavoti no inerta materiāla, kas līdz minimumam samazinātu testa vielas adsorbciju uz virsmas;

▼B

b) kratīšanas ierīce: vertikālais kratītājs vai līdzvērtīgs aprīkojums; kratīšanas ierīcei kratīšanas laikā jānotur augsne suspendētā stāvoklī;

c) centrifūga: vēlams, liela ātruma, piemēram, ar centrbēdzes spēku > 3 000 g, ar kontrolējamu temperatūru, tāda, kas var no ūdens šķīduma atdalīt daļiņas, kuru diametrs ir lielāks par 0,2 mikrometriem. Trauki kratīšanas un centrifugēšanas laikā jānoslēdz ar uzmavām, lai izvairītos no izgaišanas un ūdens zudumiem; lai līdz minimumam samazinātu adsorbciju uz uzmavām, jālieto deaktivētas uzmavas, piemēram, ar teflonu klātas uzskrūvējamas uzmavas;

d) nav obligāti: filtrēšanas ierīce; filtri ar 0,2 μm porainību, sterili, vienreizējas lietošanas. Īpaši jāpievērš uzmanība filtru materiāla izvēlei, lai izvairītos no testa vielas zudumiem uz tā; slikti šķīstošām testa vielām organiska materiāla filtri nav ieteicami;

e) analītiskie instrumenti, piemēroti testa ķimikālijas koncentrācijas mērīšanai;

f) žāvēšanas skapis, kas var uzturēt temperatūru 103 °C līdz 110 °C intervālā.

1.7.2. **Augšņu raksturošana un izvēle**

Augsnes jāraksturo ar trim parametriem, ko uzskata par tādiem, no kā lielā mērā atkarīga adsorbcijas spēja: organiskais ogleklis, mālu saturs un augsnes struktūra, pH. Kā jau minēts (skatīt "Darbības jomu"), citas augsnes fizikāli ķīmiskās īpašības var ietekmēt konkrētas vielas adsorbciju/desorbciju, un šādos gadījumos tās jāņem vērā.

Augsnes raksturošanai izmantojamās metodes ir ļoti svarīgas, un tās var ļoti nozīmīgi ietekmēt rezultātus. Tādēļ ir ieteicams augsnes pH mērīt 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā (tas ir šķīdums, ko izmanto adsorbcijas/desorbcijas testos) saskaņā ar atbilstošo ISO metodi (ISO-10390-1). Ir arī ieteicams citas attiecīgās augsnes īpašības noteikt saskaņā ar standartmetodēm (piemēram, ISO *Handbook of Soil Analysis*); tas ļauj sorbcijas datu analīzi pamatot ar starptautiski standartizētiem augsnes parametriem. Dažas pamatnostādnes esošajām augsnes analīzes un raksturošanas standartmetodēm ir dotas (50)–(52). Augsnes testu metožu kalibrēšanai ir ieteicams izmanot standarta augsnes.

Pamatnostādnes adsorbcijas/desorbcijas eksperimentu augšņu izvēlei ir dotas 1. tabulā. Septiņas izraudzītās augsnes iekļauj augšņu tipus, kas ir sastopami mērenajās ģeogrāfiskajās joslās. Augsnēm, kas izraudzītas jonizējamām testa vielām, būtu jāiekļauj plašs pH diapazons, lai varētu novērtēt vielas adsorbciju jonizētajā un nejonizētajā formā. Pamatnostādnes, cik daudzas dažādas augsnes lietot dažādos testa posmos, ir dotas 1.9. punktā "Testa izpildīšana".

Ja priekšroku dod citiem augšņu tipiem, tās jāraksturo ar vieniem un tiem pašiem parametriem un to īpašībām jāmainās līdzīgi, kā aprakstīts 1. tabulā, pat ja tās precīzi neatbilst attiecīgajiem kritērijiem.

▼B

1. tabula

Pamatnostādnes augsnes paraugu izvēlei adsorbcijai/desorbcijai

Augsnes tips	pH diapazons (0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā)	Organiskā oglekļa saturs (%)	Mālu saturs (%)	Augsnes struktūra ([1])
1	4,5—5,5	1,0—2,0	65–80	māli
2	> 7,5	3,5—5,0	20–40	viegls māls
3	5,5—7,0	1,5—3,0	15–25	viegls smilšmāls
4	4,0—5,5	3,0—4,0	15–30	smilšmāls
5	< 4,0—6,0 ([2])	< 0,5—1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	mālsmilts
6	> 7,0	< 0,5—1,0 ([2]) ([3])	40–65	viegls māls/māls
7	< 4,5	> 10	< 10	smilts/mālsmilts

([1]) Saskaņā ar *FAO* un ASV sistēmu (85).
([2]) Attiecīgos mainīgos lielumus būtu vēlams iekļaut norādītajā diapazonā. Ja tomēr rodas grūtības atrast piemērotu augsnes materiālu, ir pieļaujami lielumi, kas mazāki par norādīto minimumu.
([3]) Augsnes, kurās ir mazāk par 0,3 % organiskā oglekļa, var deformēt korelāciju starp organisko vielu saturu un adsorbciju. Tādēļ ir ieteicams izmantot augsnes ar minimālo organiskā oglekļa saturu 0,3 %.

1.7.3. **Augsnes paraugu savākšana un glabāšana**

1.7.3.1. *Savākšana*

Īpaša paraugu ņemšanas metode vai rīki nav ieteikti; paraugu ņemšanas metode ir atkarīga no pētījuma mērķa (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Jāņem vērā sekojošais:

a) ir vajadzīga sīka informācija par lauka vēsturi; tā ietver atrašanās vietu, augu segu, apstrādi ar pesticīdiem un/vai mēslošanas līdzekļiem, bioloģiskās piedevas vai nejaušu piesārņojumu. Attiecībā uz paraugu ņemšanas vietu jāievēro ISO standarta par augsnes paraugu ņemšanu ieteikumi (ISO 10381-6);

b) paraugu ņemšanas vieta jādefinē ar *UTM* (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) koordinātām vai ģeogrāfiskajām koordinātām; tas varētu dot iespēju nākotnē no jauna savākt konkrētu augsni vai varētu palīdzēt definēt augsni atšķirīgās klasifikācijas sistēmās, ko lieto dažādās valstīs. Turklāt ir jāvāc tika A horizonts līdz 20 cm maksimālajam dziļumam. Īpaši ja Nr. 7 tipa augsnē kā augsnes daļa ir klāt horizonts Oh, tas jāiekļauj paraugā.

Augsnes paraugi jātransportē tādās tvertnēs un temperatūras apstākļos, kas garantē, ka augsnes sākotnējās īpašības jūtami nemainās.

▼B

1.7.3.2. *Glabāšana*

Priekšroka dodama augsnēm, kas tikko ņemtas no lauka. Vienīgi, ja tas nav iespējams, augsnes var glabāt apkārtējās vides temperatūrā, un tās jāglabā gaisa sausas. Glabāšanas laika ierobežojumi nav ieteikti, bet augsnes, kas glabātas ilgāk par trim gadiem, pirms lietošanas jāanalizē no jauna attiecībā uz organiskā oglekļa saturu, pH un katjonapmaiņas spēju.

1.7.3.3. *Augsnes paraugu apstrāde un sagatavošana testam*

Augsnes izžāvē gaisa sausas apkārtējās vides temperatūrā (vēlams 20–25 °C). Irdināšana jāizdara ar minimālu spēku, lai augsnes sākotnējā struktūra mainītos iespējami mazāk. Augsnes izsijā līdz daļiņu lielumam ≤ 2 mm. Attiecībā uz sijāšanas procesu jāievēro ISO standarta par augsnes paraugu ņemšanu ieteikumi (ISO 10381-6). Ir ieteicams augsni rūpīgi homogenizēt, jo tas uzlabo rezultātu atkārtojamību. Katras augsnes mitruma saturu nosaka trim alikvotiem, sildot 105 °C temperatūrā, līdz nemainīgam svaram (aptuveni 12 stundas). Visos aprēķinos augsnes masa attiecināma uz žāvēšanas skapī izžāvētu sausu masu, t. i., augsnes svaru koriģē uz mitruma saturu.

1.7.4. **Testa vielas sagatavošana piemērošanai augsnē**

Testa vielu izšķīdina 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā destilētā vai dejonizētā ūdenī; $CaCl_2$ šķīdumu izmanto kā ūdens šķīdinātāja fāzi, lai uzlabotu centrifugēšanu un līdz minimumam samazinātu katjonapmaiņu. Izejas šķīduma koncentrācijai vēlams būt par trim kārtas lielumiem lielākai par izmantojamās analītiskās metodes atklāšanas robežu. Šis slieksnis nodrošina precīzus mērījumus attiecībā uz šajā metodē izmantoto metodiku; turklāt izejas šķīduma koncentrācijai jābūt mazākai par testa vielas šķīdību ūdenī.

Izejas šķīdumu vēlams pagatavot tieši pirms lietošanas uz augsnes paraugiem, un tas jāglabā noslēgtā traukā tumsā 4 °C temperatūrā. Glabāšanas ilgums ir atkarīgs no testa vielas stabilitātes un tās koncentrācijas šķīdumā.

Vienīgi slikti šķīstošām vielām ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) var būt vajadzīgs piemērots šķīdību palielinošs reaģents, ja ir grūti izšķīdināt testa vielu. Šķīdību palielinošajam reaģentam: a) jājaucas ar ūdeni, piemēram, tas var būt metanols vai acetonitrils; b) tā daudzums nedrīkst būt lielāks par 1 % no izejas šķīduma kopējā tilpuma, un tam jāveido vēl mazāka daļa testa vielas šķīdumā, kurš saskarsies ar augsni (vēlams mazāk par 0,1 %); un c) nav jābūt virsmas aktīvam vai jāreaģē ar testa ķimikāliju solvolīzes reakcijās. Šķīdību palielinošā reaģenta izmantošana ir jāizvirza un jāpamato darba protokolā.

Cita alternatīva slikti šķīstošām vielām ir pievienot testa vielu testa sistēmai ar palīgšķīdinātāju: testa vielu izšķīdina organiskā šķīdinātājā, kura alikvotu pievieno sistēmai, ko veido augsne un 0,01 M $CaCl_2$ šķīdums destilētā vai dejonizētā ūdenī. Organiskā šķīdinātāja saturam ūdens fāzē jābūt iespējami mazam, parasti ne lielākam par 0,1 %. Organiskā šķīduma piejaukšana var radīt sliktu tilpuma atkārtojamību. Tā var rasties papildu kļūda, jo testa vielas un palīgšķīdinātāja koncentrācija visos testos nebūs vienāda.

▼B

1.8. ADSORBCIJAS/DESORBCIJAS TESTA IZDARĪŠANAS PRIEKŠNOTEIKUMI

1.8.1. **Analītiskā metode**

Galvenie parametri, kas var ietekmēt sorbcijas mērījumu precizitāti, ir analītiskās metodes precizitāte šķīduma un adsorbētās fāzes analīzē, testa vielas stabilitāte un tīrība, sorbcijas līdzsvara sasniegšana, šķīduma koncentrācijas maiņas lielums, augsnes/šķīduma attiecība un augsnes struktūras pārmaiņas līdzsvara iestāšanās procesa laikā (35) (59)–(62). Daži piemēri, kas attiecas uz precizitātes jautājumiem, ir doti 2. papildinājumā.

Izmantojamās analītiskās metodes ticamība ir jāpārbauda koncentrāciju diapazonā, kāds sagaidāms testa laikā. Eksperimentators var brīvi izveidot piemērotu metodi ar piemērotu pareizību, precizitāti, atkārtojamību, atklāšanas robežām un nosakāmo daudzumu. Pamatnostādnes, kā izdarīt šādu testu, ir dotas turpmāk aprakstītajā eksperimentā.

Piemērotu 0,01 M $CaCl_2$ tilpumu, piemēram, 100 cm^3, krata četras stundas ar tādas augsnes iesvaru, piemēram, 20 g, kurai ir liela adsorbcijas spēja, t. i., liels organiskā oglekļa un mālu saturs; iesvarus un tilpumus var mainīt atkarībā no analītiskajām vajadzībām, bet augsnes/šķīduma attiecība 1:5 ir ērts sākuma punkts. Maisījumu centrifugē un ūdens fāzi var nofiltrēt. Ūdens fāzei pievieno noteiktu testa vielas izejas šķīduma tilpumu, lai sasniegtu nominālo koncentrāciju tajā koncentrāciju diapazonā, kāds sagaidāms testa laikā. Minētais tilpums nedrīkst pārsniegt 10 % no ūdens fāzes galīgā tilpuma, lai iespējami mazāk mainītu pirmslīdzsvara stāvokļa šķīduma īpašības. Šķīdumu analizē.

Lai izslēgtu metodes nejaušās kļūdas un augsnes radītos matricas efektus, ir jāiekļauj viens tukšais mēģinājums, kas sastāv no sistēmas: augsne + $CaCl_2$ šķīdums (bez testa vielas).

Analītiskās metodes, ko var izmantot sorbcijas mērījumiem, iekļauj gāzu šķidruma hromatogrāfiju (GLC), augstas izšķiršanas šķidrumu hromatogrāfiju (*HPLC*), spektrometriju (piemēram, GC/masspektrometriju, *HPLC*/masspektrometriju) un šķidrumu scintilācijas skaitīšanu (radioaktīvi iezīmētām vielām). Neatkarīgi no izmantotās analītiskās metodes to uzskata par piemērotu, ja atgūtais daudzums ir starp 90 % un 110 % no nominālllieluma. Lai varētu izdarīt kvantitatīvo noteikšanu un novērtēšanu pēc sadalīšanas, analītiskās metodes atklāšanas robežām jābūt vismaz par diviem kārtas lielumiem mazākām par nominālo koncentrāciju.

Adsorbcijas pētījumiem pieejamās analītiskās metodes parametriem un atklāšanas robežām ir svarīga loma testa apstākļu definēšanā un visā testa eksperimenta izpildē. Šeit piedāvātā metode izklāsta vispārīgo eksperimenta gaitu un sniedz ieteikumus un pamatnostādnes alternatīviem risinājumiem, ja analītiskā metode un laboratorijas aprīkojums varētu uzlikt ierobežojumus.

▼B

1.8.2. **Optimālas augsnes/šķīduma attiecības izvēle**

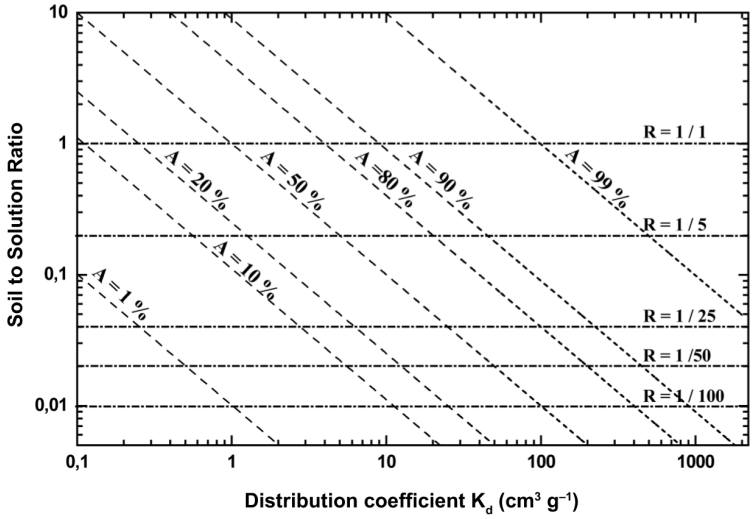
Piemērotas augsnes attiecības pret šķīdumu izvēle sorbcijas pētījumiem ir atkarīga no sadalījuma koeficienta K_d un vēlamās relatīvās adsorbcijas pakāpes. Vielas koncentrācijas pārmaiņas šķīdumā nosaka mērījumu statistisko pareizību, kas pamatojas uz adsorbcijas vienādojuma formu un analītiskās metodikas robežām ķimikālijas koncentrāciju noteikšanā šķīdumā. Tāpēc vispārējā praksē ir lietderīgi noteikt dažas nemainīgas attiecības, kurām adsorbētais procentuālais daudzums ir virs 20 % un, vēlams, > 50 % (62), ievērojot, ka testa vielas koncentrācijai ūdens fāzē jābūt pietiekami augstai, lai to varētu precīzi izmērīt. Tas ir jo īpaši nozīmīgi liela adsorbcijas procentuālā daudzuma gadījumā.

Ērta pieeja piemērotas augsnes/ūdens attiecības izvēlei pamatojas uz K_d lielumu, kas noteikts priekšmēģinājumā vai ar izveidotu noteikšanas metodi (3. papildinājums). Piemērotu augsnes/ūdens attiecību pēc tam var izvēlēties no grafika, ko iegūst, atliekot augsnes/ūdens attiecību atkarībā no K_d konkrētiem adsorbcijas procentuālajiem daudzumiem (1. attēls). Šajā grafikā pieņem, ka adsorbcijas vienādojums ir lineārs ([1]). Pielietojamo sakarību iegūst, pārveidojot K_d 4. vienādojumu 1. vienādojuma veidā:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

vai logaritmiskā formā, pieņemot, ka $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$



1. attēls. Augsnes/šķīduma attiecības sakarība ar K_d pie dažādiem adsorbētās testa vielas procentuālajiem daudzumiem

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

1. attēls rāda vajadzīgās augsnes/šķīduma attiecības kā K_d funkciju dažādiem adsorbcijas līmeņiem. Piemēram, pie augsnes/šķīduma attiecības 1:5 un K_d = 20 adsorbēti ir aptuveni 80 %. Lai iegūtu 50 % adsorbciju pie tā paša K_d, ir jālieto 1:25 attiecība. Šī pieeja piemērotas augsnes/šķīduma attiecības izvēlei dod pētniekam iespēju elastīgi piemēroties eksperimenta vajadzībām.

Lielākas grūtības rodas, ja ķimikālijas adsorbējas stipri vai ļoti nedaudz. Ja adsorbcija ir niecīga, ir ieteicams izmantot augsnes/šķīduma attiecību 1:1, kaut arī dažiem ļoti organisku augšņu tipiem var būt vajadzīga mazāka attiecība, lai izveidotos dubļu putriņa. Jābūt uzmanīgiem ar analīzes metodiku, mērot mazas šķīduma koncentrācijas pārmaiņas; citādi adsorbcijas mērījumi būs nepareizi. No otras puses, pie ļoti lieliem sadalījuma koeficientiem Kd augsnes/šķīduma attiecību var palielināt līdz 1:100, lai šķīdumā paliktu nozīmīgs ķimikālijas daudzums. Tomēr jāpievērš uzmanība labas sajaukšanas nodrošināšanai un jādod sistēmai pietiekams laiks līdzsvara sasniegšanai. Alternatīva pieeja šiem galējiem gadījumiem, ja nav piemērotas analīzes metodikas, ir iepriekš novērtēt Kd lielumu, izmantojot aptuvenas novērtēšanas metodes, kas balstās, piemēram, uz P_{ow} lielumiem (3. papildinājums). Tas jo īpaši var noderēt maz adsorbētām/polārām ķimikālijām ar $P_{ow} < 20$ un lipofīlām/stipri adsorbējamām vielām ar $P_{ow} > 10^4$.

1.9. TESTA IZPILDĪŠANA

1.9.1. Testa apstākļi

Visus eksperimentus izdara apkārtējās vides temperatūrā un, ja iespējams, nemainīgā temperatūrā starp 20 °C un 25 °C.

Centrifugēšanas apstākļiem jābūt tādiem, lai varētu atdalīt no šķīduma daļiņas, lielākas par 0,2 μm. Šis lielums atbilst mazākajai daļiņai, ko uzskata par cietu daļiņu, un tā ir robeža starp cietu un koloidālu daļiņu. Pamatnostādnes, kā noteikt centrifugēšanas apstākļus, ir dotas 4. papildinājumā.

Ja centrifugēšanas aprīkojums nevar nodrošināt atdalīšanu daļiņām, kas ir lielākas par 0,2 μm, var izmantot centrifugēšanas apvienojumu ar 0,2 μm filtriem. Filtriem jābūt izgatavotiem no piemērota inerta materiāla, lai izvairītos no testa vielas zudumiem uz filtriem. Katrā ziņā būtu jāpārbauda, vai filtrējot nerodas testa vielas zudumi.

1.9.2. **Testa 1. posms – priekšmēģinājumi**

Priekšmēģinājumu izdarīšanas mērķis jau ir dots iedaļā "Darbības joma". Pamatnostādnes šāda testa izveidošanai ir dotas turpmāk piedāvātajā eksperimentā.

1.9.2.1. *Optimālas augsnes/šķīduma attiecības izvēle*

Izmanto divu tipu augsnes un trīs augsnes/šķīduma attiecības (seši eksperimenti). Viena tipa augsnē ir liels organiskā oglekļa saturs un mazs mālu saturs, un otrā augsnē ir mazs organiskā oglekļa saturs un liels mālu saturs. Ir ieteicamas šādas augsnes/šķīduma attiecības:

— 50 g augsnes un 50 cm^3 testa vielas šķīduma ūdenī (attiecība 1:1),

▼B

— 10 g augsnes un 50 cm^3 testa vielas šķīduma ūdenī (attiecība 1:5),

— 2 g augsnes un 50 cm^3 testa vielas šķīduma ūdenī (attiecība 1:25),

Minimālais augsnes daudzums, ar ko var izdarīt eksperimentu, ir atkarīgs no laboratorijas aprīkojuma un izmantoto analītisko metožu efektivitātes. Tomēr ir ieteicams izmantot vismaz 1 g un, vēlams, 2 g, lai iegūtu ticamus testa rezultātus.

Vienu kontroles paraugu, kas satur tikai testa vielu 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā (bez augsnes) pakļauj precīzi tiem pašiem posmiem kā testa sistēmas, lai pārbaudītu testa vielas stabilitāti $CaCl_2$ šķīdumā un tās iespējamo adsorbciju uz testa trauku virsmām.

Tai pašai testa procedūrai pakļauj augsnes tukšo mēģinājumu ar to pašu augsnes daudzumu un 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma 50 cm^3 kopējo tilpumu (bez testa vielas). Tas analīzē kalpo kā fona kontrole, lai noteiktu traucējošās vielas vai piesārņotas augsnes.

Visi eksperimenti, iekļaujot kontroles mēģinājumus un tukšos mēģinājumus, jāveic vismaz divas reizes. Pētījumam sagatavojamo paraugu kopējo skaitu var aprēķināt attiecībā uz izmantojamo metodiku.

Priekšmēģinājumu un galvenā pētījuma metodes pamatā ir vienas un tās pašas, izņēmumi attiecīgā gadījumā ir minēti.

Gaisa sausiem augsnes paraugiem ļauj sasniegt līdzsvara stāvokli, pirms eksperimenta dienas kratot visu nakti (12 stundas) ar vismaz 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Pēc tam pievieno testa vielas izejas šķīduma tilpumu, kāds vajadzīgs, lai sasniegtu galīgo tilpumu 50 cm^3. Šis izejas šķīdumam pievienotais tilpums: a) nepārsniedz 10 % no ūdens fāzes 50 cm^3 galīgā tilpuma, lai iespējami mazāk mainītu pirmslīdzsvara stāvokļa šķīduma īpašības; b) vēlams dot testa vielas, kas ir saskarē ar augsni, sākotnējo koncentrāciju (C_0), kas ir vismaz par diviem kārtas lielumiem lielāka nekā analītiskās metodes atklāšanas robeža; šis ierobežojums nodrošina iespēju veikt pareizus mērījumus, pat ja notiek stipra adsorbcija (> 90 %), un vēlāk noteikt adsorbcijas izotermas. Ir arī ieteicams, ja tas ir iespējams, lai sākotnējā koncentrācija (C_0) nepārsniegtu pusi no vielas šķīdības robežas.

Piemērs, kā aprēķināt izejas šķīduma koncentrāciju (C_{st}), ir dots turpmāk. Pieņem, ka atklāšanas robeža ir 0,01 μg cm^{-3} un adsorbcija 90 %; tādā veidā ar augsni saskarē esošās testa vielas sākotnējai koncentrācijai, vēlams būt 1 μg cm^{-3} (divus kārtas lielumus lielākai par atklāšanas robežu). Pieņemot, ka ir pievienots maksimālais ieteicamais izejas šķīduma tilpums, t. i., 5 cm^3 pie 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma (= 10 % no izejas šķīduma 50 cm^3 kopējā ūdens fāzes tilpuma), izejas šķīduma koncentrācijai jābūt 10 μg cm^{-3}; tas ir par trim kārtas lielumiem vairāk par analītiskās metodes atklāšanas robežu.

Ūdens fāzes pH jāmēra pirms saskares ar augsni un pēc tam, jo tam ir liela nozīme visā adsorbcijas procesā, jo īpaši jonizējamām vielām.

▼B

Maisījumu krata, līdz ir sasniegts adsorbcijas līdzsvars. Līdzsvara iestāšanās laiks augsnēs ir ļoti atšķirīgs atkarībā no ķimikālijas un augsnes; 24 stundu laika posms parasti ir pietiekami ilgs (77). Priekšmēģinājumā paraugus var ņemt secīgi 48 maisīšanas stundu laikā (piemēram, pēc 4, 8, 24, 48 stundām). Tomēr analīzes laiks būtu jāapsver elastīgi, ievērojot laboratorijas darba grafiku.

Ir divas iespējas analizēt testa vielas ūdens šķīdumu: a) paralēlā metode un b) virknes metode. Ir jāuzsver, ka, kaut arī paralēlā metode eksperimentāli ir laika ietilpīgāka, rezultātu matemātiskā apstrāde ir vienkāršāka (5. papildinājums). Tomēr metodikas izvēle ir atstājama eksperimentatoram, kuram ir jāņem vērā laboratorijas aprīkojums un resursi.

a) Paralēlā metode: sagatavo tik daudz paraugus ar vienu un to pašu augsnes/šķīduma attiecību, cik ir laika intervālu, kuros vēlas pētīt adsorbcijas kinētiku. Pēc centrifugēšanas un, ja vēlas, filtrēšanas pirmās mēģenes ūdens fāzi iespējami pilnīgi atgūst un izmēra, piemēram, pēc 4 stundām, ar otrās mēģenes ūdens fāzi to dara pēc 8 stundām, ar trešās – pēc 24 stundām utt.;

b) virknes metode: katrai augsnes/šķīduma attiecībai sagatavo tikai vienu paraugu divos eksemplāros. Noteiktos laika intervālos maisījumu centrifugē, lai atdalītu fāzes. Nelielā ūdens fāzes alikvotā daļā tūlīt analizē testa vielu; pēc tam eksperimentu turpina ar sākotnējo maisījumu. Ja pēc centrifugēšanas izdara filtrēšanu, laboratorijai ir vajadzīgs aprīkojums mazu ūdens alikvotu filtrēšanai. Ir ieteicams, ka ņemto alikvotu tilpums kopā nepārsniedz 1 % no šķīduma kopējā tilpuma, lai būtiski nemainītos augsnes/šķīduma attiecība un lai nesamazinātu izšķīdušās vielas masu, kas testa laikā pieejama adsorbcijai.

Adsorbcijas procentuālo daudzumu A_{t_i} aprēķina katrā laika punktā (t_i), pamatojoties uz nominālo sākotnējo koncentrāciju un parauga ņemšanas laikā (t_i), izmērīto koncentrāciju, kas koriģēta uz tukšo mēģinājumu. Lai noteiktu līdzsvara plato, grafiski atliek A_{t_i} atkarībā no laika (5. papildinājuma 1. attēls) ([1]). Aprēķina arī K_d lielumu līdzsvara stāvoklī. Pamatojoties uz K_d lielumu, 1. attēlā izvēlas piemērotu augsnes/šķīduma attiecību tā, lai adsorbcijas procentuālais daudzums būtu virs 20 % un vēlams > 50 % (61). Visi izmantojamie vienādojumi un grafika konstruēšanas principi ir iedaļā "Dati un to noformēšana" un 5. papildinājumā.

1.9.2.2. *Adsorbcijas līdzsvara iestāšanās laika un līdzsvara stāvoklī adsorbētās testa vielas daudzuma noteikšana*

Kā jau minēts, A_{t_i} vai C_{aq}^{ads} atkarības no laika grafiskais attēlojums ļauj noteikt adsorbcijas līdzsvara sasniegšanu un līdzsvara stāvoklī adsorbēto testa vielas daudzumu. 5. papildinājuma 1. un 2. attēls rāda šādu grafiku piemērus. Līdzsvara iestāšanās laiks ir laiks, kas sistēmai vajadzīgs, lai sasniegtu līdzsvaru.

([1]) Lai noteiktu līdzsvara plato, var izmantot arī grafiku, kas attēlo testa vielas koncentrācijas ūdens fāzē (C_{aq}^{ads}) atkarību no laika (skatīt 5. papildinājuma 2. attēlu).

▼B

Ja konkrētai augsnei nav konstatējams plato, bet vienmērīgs palielinājums, tā cēlonis var būt komplicējoši faktori, piemēram, bionoārdīšanās vai lēna difūzija. Bionoārdīšanos var pierādīt, atkārtojot eksperimentu ar sterilizētu augsnes paraugu. Ja pat šajā gadījumā nav sasniegts plato, eksperimentatoram būtu jāmeklē citas parādības, kas varētu būt iesaistītas konkrētajā pētījumā; to var izdarīt attiecīgi mainot eksperimenta apstākļus (temperatūru, kratīšanas laiku, augsnes/šķīduma attiecības). Eksperimentatoram ir jāizlemj, vai turpināt testa procedūru, neraugoties uz to, ka līdzsvara stāvokli, iespējams, nevarēs sasniegt.

1.9.2.3. *Adsorbcija uz testa trauka virsmas un testa vielas stabilitāte*

Daļēju informāciju par testa vielas adsorbciju uz testa trauku virsmas, kā arī par testa vielas stabilitāti var iegūt, analizējot kontroles paraugus. Ja ir novērojams samazinājums, lielāks par analītiskās metodes standarta kļūdu, varētu būt iesaistīta abiotiska noārdīšanās un/vai adsorbcija uz testa trauka virsmas. Abas šīs parādības var atšķirt, ja rūpīgi nomazgā trauka sienas ar zināmu tilpumu piemērota šķīdinātāja un mazgāšanas šķīdumā analizē testa vielu. Ja adsorbcija uz testa trauka virsmas nav novērota, samazinājums rāda testa vielas abiotisko nestabilitāti. Ja ir konstatēta adsorbēšanās, ir jāmaina testa trauku materiāls. Tomēr šajā eksperimentā iegūtos datus par adsorbciju uz testa trauku virsmas nevar tieši ekstrapolēt uz augsnes/šķīduma eksperimentu. Augsnes klātbūtne ietekmē šo adsorbciju.

Papildu informāciju par testa vielas stabilitāti var iegūt, nosakot masas bilanci atkarībā no laika. Tas nozīmē, ka testa vielu analizē ūdens fāzē, augsnes ekstraktos un uz testa trauku sienām. Starpība starp pievienotās testa vielas masu un testa vielas masu summu ūdens fāzē, augsnes ekstraktos un uz testa trauka sienām ir vienāda ar sadalījušās un/vai izgaisušās un/vai neekstrahētās vielas masu. Lai noteiktu masas bilanci, eksperimenta laikā jāsasniedz adsorbcijas līdzsvars.

Masas bilanci nosaka gan augsnēm, gan vienai augsnes/šķīduma attiecībai katrai augsnei, kas līdzsvara stāvoklī dod samazinājumu virs 20 % un, vēlams, > 50 %. Kad ar pēdējā ūdens fāzes parauga analīzi pēc 48 stundām ir pabeigts attiecības atrašanas eksperiments, fāzes atdala centrifugējot un, ja vēlas, filtrējot. Ūdens fāzi atgūst iespējami pilnīgi un augsnei pievieno piemērotu ekstrahēšanas šķīdinātāju (ekstrakcijas koeficients vismaz 95 %). Ieteicams izdarīt vismaz divas secīgas ekstrahēšanas. Nosaka testa vielas daudzumu augsnē un testa trauka ekstraktos un aprēķina masas bilanci (Dati un to noformēšana, vienādojums (10)). Ja tā ir mazāka par 90 %, uzskata, ka testa viela nav stabila testa laika mērogā. Tomēr pētījumu var turpināt, ja testa vielas nestabilitāti ņem vērā; šajā gadījumā ir ieteicams abas fāzes analizēt galvenajā pētījumā.

▼B

1.9.2.4. *2. posms – adsorbcijas kinētika pie vienas testa vielas koncentrācijas*

Izmanto no 1. tabulas izraudzītas piecas augsnes. Ir izdevīgi šajās piecās augsnēs iekļaut dažas vai visas augsnes, kas attiecīgi izmantotas priekšmēģinājumos. Tādā gadījumā 2. posms nav jāatkārto augsnēm, kas izmantotas priekšmēģinājumos.

Līdzsvara iestāšanās laiku, augsnes/šķīduma attiecību, augsnes parauga svaru, ūdens fāzes, kas saskaras ar augsni, tilpumu un testa vielas koncentrāciju šķīdumā izvēlas, pamatojoties uz priekšmēģinājumu rezultātiem. Analīzi būtu vēlams izdarīt aptuveni pēc 2, 4, 6, 8 (ja iespējams, arī pēc 10) un 24 stundām saskares laika; kratīšanas laiku var pagarināt maksimāli līdz 48 stundām gadījumā, ja ķimikālijai vajadzīgs ilgāks laiks līdzsvara sasniegšanai, lai varētu iegūt attiecības noteikšanas rezultātus. Tomēr analīzes laiku var noteikt elastīgi.

Katru eksperimentu (viena augsne un viens šķīdums) izdara vismaz divos eksemplāros, lai varētu noteikt rezultātu dispersiju. Katrā eksperimentā izdara vienu tukšo mēģinājumu. Tas sastāv no augsnes un 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma bez testa vielas, un attiecīgais svars un tilpums ir identisks eksperimentā izmantotajam svaram un tilpumam. To pašu testa procedūru izdara ar testa vielu 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā (bez augsnes), lai nodrošinātos pret nejaušību.

Adsorbcijas procentuālo daudzumu aprēķina katrā laika punktā A_{t_i} un/vai laika intervālā $A_{\Delta t_i}$ (atkarībā no vajadzības) un atliek grafikā atkarībā no laika. Aprēķina arī sadalījuma koeficientu līdzsvara stāvoklī K_d un organiskā oglekļa normalizēto adsorbcijas koeficientu K_{oc} (nepolārām organiskām ķimikālijām).

Adsorbcijas kinētikas testa rezultāti

Lineārais K_d lielums parasti ir precīzs sorbcijas aprakstīšanai augsnē (35) (78), un tas raksturo ķimikālijām piemītošo kustīgumu augsnē. Piemēram, parasti ķimikālijas ar $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} uzskata par kvalitatīvi kustīgām. Līdzīgi kustīguma klasifikācijas shēmu, kas pamatojas uz K_{oc} lielumiem, ir izveidojis *Makols et al.* (16). Turklāt pastāv izskalošanas klasifikācijas shēmas, kas pamatojas uz attiecību starp Koc un DT-50 ([1]) (32) (79).

Saskaņā ar kļūdu analīzes pētījumu (61) K_d lielumus, kas ir mazāki par 0,3 cm^3 g^{-1}, no koncentrācijas samazinājuma ūdens fāzē pareizi noteikt nevar, pat ja izmanto vislabāko (no rezultātu precizitātes viedokļa) augsnes/šķīduma attiecību, t. i., 1:1. Tādā gadījumā ir ieteicams analizēt abas fāzes – augsni un šķīdumu.

([1]) DT_{50}: laiks, kurā noārdās 50 % no testa vielas.

▼B

Attiecībā uz iepriekšminētajām piezīmēm ir ieteicams turpināt ķimikālijas adsorbcijas augsnē un ķimikālijas potenciālā kustīguma pētījumu, nosakot Freindliha adsorbcijas izotermas tām sistēmām, kurām ir iespējams pareizi noteikt K_d, ievērojot šīs testa metodes eksperimenta protokolu. Pareiza noteikšana ir iespējama, ja K_d reizinājuma ar augsnes/šķīduma attiecību lielums ir > 0,3 gadījumā, ja mērījumi pamatojas uz koncentrācijas samazināšanos ūdens fāzē (netiešā metode), vai reizinājuma lielums ir > 0,1 gadījumā, ja analizē abas fāzes (tiešā metode) (61).

1.9.2.5. *Testa 3. posms – adsorbcijas izotermas un desorbcijas kinētika/desorbcijas izotermas*

1.9.2.5.1. Adsorbcijas izotermas

Izmanto piecas testa vielas koncentrācijas, kas, vēlams, iekļauj divus kārtas lielumus; izvēloties šīs koncentrācijas, ir jāņem vērā vielas šķīdība ūdenī un no tās izrietošās ūdens šķīduma koncentrācijas līdzsvara stāvoklī. Visā pētījumā jāsaglabā viena un tā pati augsnes/šķīduma attiecība katrai augsnei. Adsorbcijas testu izdara, kā aprakstīts iepriekš, vienīgā atšķirība ir, ka ūdens fāze ir 2. posmā. Nosaka līdzsvara koncentrācijas šķīdumā un adsorbēto daudzumu aprēķina no testa vielas samazinājuma šķīdumā vai ar tiešo metodi. Adsorbēto masu uz augsnes masas vienību atliek grafiski kā testa vielas līdzsvara koncentrācijas funkciju (skatīt "Dati un to noformēšana").

Adsorbcijas izotermu eksperimenta rezultāti

No matemātiskajiem adsorbcijas modeļiem, kas līdz šim ir piedāvāti, Freindliha adsorbcijas izotermu adsorbcijas procesa aprakstīšanai lieto visbiežāk. Sīkāk izstrādāta informācija par adsorbcijas modeļu interpretāciju un to svarīgumu ir sniegta (41), (45), (80), (81), (82).

Piezīme: jāuzsver, ka K_F (Freindliha adsorbcijas koeficientu) lielumu salīdzināšana dažādām vielām ir iespējama tikai tad, ja K_F lielumi ir izteikti vienās un tajās pašās vienībās (83).

1.9.2.5.2. Desorbcijas kinētika

Šā eksperimenta mērķis ir izpētīt, vai ķimikālija uz augsnes adsorbējas atgriezeniski vai neatgriezeniski. Šī informācija ir svarīga, jo desorbcijas procesam arī ir liela nozīme attiecībā uz ķimikālijas izturēšanos augsnē lauka apstākļos. Turklāt desorbcijas dati ir noderīgi ieejas dati izskalošanās modelēšanā ar datoru un izšķīdušās vielas aizplūšanas simulēšanā ar datoru. Ja vēlas izdarīt desorbcijas pētījumu, ir ieteicams turpmāk aprakstīto pētījumu izdarīt katrai sistēmai, kurai iepriekšējā adsorbcijas kinētikas eksperimentā ir bijusi iespējama pareiza K_d noteikšana.

Tāpat kā adsorbcijas kinētikas pētījumā ir divas iespējas izdarīt arī desorbcijas kinētikas eksperimentu: a) paralēlā metode un b) virknes metode. Tomēr metodikas izvēle ir atstājama eksperimentatoram, kuram ir jāņem vērā pieejamais laboratorijas aprīkojums un resursi.

▼B

a) Paralēlā metode: katrai augsnei, kas ir izraudzīta desorbcijas pētījuma veikšanai, sagatavo tik daudzus paraugus ar vienu un to pašu augsnes/šķīduma attiecību, cik ir laika intervālu, kuros grib pētīt desorbcijas kinētiku. Vēlams izmanto tos pašus laika intervālus kā adsorbcijas kinētikas eksperimentā; tomēr kopējo laiku var pēc vajadzības pagarināt, lai sistēma sasniegtu desorbcijas līdzsvaru. Katrā eksperimentā (viena augsne, viens šķīdums) izdara tukšo mēģinājumu. Tas sastāv no augsnes un 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma bez testa vielas, un attiecīgais svars un tilpums ir identisks eksperimentā izmantotajam svaram un tilpumam. Ar testa vielu 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā (bez augsnes) kā ar kontroles paraugu izdara to pašu testa procedūru. Visus augsnes maisījumus ar šķīdumu krata līdz adsorbcijas līdzsvara sasniegšanai (kā noteikts iepriekš 2. posmā). Pēc tam fāzes atdala centrifugējot un ūdens fāzes, cik iespējams, aizvada. Aizvadīto šķīduma tilpumu aizvieto ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ tilpumu bez testa vielas un jaunos maisījumus atkal krata. Pirmās mēģenes ūdens fāzi iespējami pilnīgi atgūst un izmēra, piemēram, pēc divām stundām, otrās mēģenes ūdens fāzi – pēc četrām stundām, trešās – pēc sešām stundām utt., līdz ir sasniegts desorbcijas līdzsvars.

b) Virknes metode: pēc adsorbcijas kinētikas eksperimenta maisījumu centrifugē un ūdens fāzi iespējami pilnīgi aizvada. Aizvadīto šķīduma tilpumu aizvieto ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpumu bez testa vielas. Jauno maisījumu krata, līdz ir sasniegts desorbcijas līdzsvars. Šajā laika posmā noteiktos laika intervālos maisījumu centrifugē, lai atdalītu fāzes. Nelielā ūdens fāzes alikvotā tūlīt analizē testa vielu; pēc tam eksperimentu turpina ar sākotnējo maisījumu. Katra atsevišķā alikvota tilpumam jābūt mazākam par 1 % no kopējā tilpuma. Lai saglabātu to pašu augsnes/šķīduma attiecību, maisījumam pievieno tādu pašu daudzumu svaiga 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma un turpina kratīt līdz nākošajam laika intervālam.

Desorbcijas procentuālo daudzumu aprēķina katrā laika punktā (D_{t_i}) un/vai laika intervālā ($D_{\Delta t_i}$) (saskaņā ar pētījuma vajadzībām) un atliek grafiski atkarībā no laika. Aprēķina arī desorbcijas koeficienta K_{des} lielumu līdzsvara stāvoklī. Visi izmantojamie vienādojumi ir iedaļā "Dati un to noformēšana" un 5. papildinājumā.

Desorbcijas kinētikas eksperimenta rezultāti

Kopējā grafikā atlikts desorbcijas procentuālais daudzums D_{t_i} un adsorbcijas procentuālais daudzums A_{t_i} atkarībā no laika ļauj novērtēt adsorbcijas procesa atgriezeniskumu. Ja desorbcijas līdzsvars tiek sasniegts pat divreiz ilgākā laikā nekā adsorbcijas līdzsvars un ja kopējā desorbcija ir vairāk par 75 % no adsorbētā daudzuma, adsorbciju uzskata par atgriezenisku.

1.9.2.5.3. Desorbcijas izotermas

Freindliha desorbcijas izotermas nosaka augsnēm, kas izmantotas adsorbcijas izotermu eksperimentā. Desorbcijas testu izdara, kā aprakstīts iedaļā "Desorbcijas kinētika" ar vienīgo atšķirību, ka ūdens fāzi analizē tikai vienreiz desorbcijas līdzsvara stāvoklī. Aprēķina desorbētās testa vielas daudzumu. Testa vielas saturu, kas palicis adsorbēts uz augsnes desorbcijas līdzsvara stāvoklī, atliek grafikā kā testa vielas līdzsvara koncentrācijas šķīdumā funkciju (skatīt "Dati un to noformēšana" un 5. papildinājumu).

▼B

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

Analīzes datus noformē tabulas veidā (skatīt 6. papildinājumu). Uzdod atsevišķus mērījumus un aprēķinātos vidējos lielumus. Adsorbcijas izotermas sniedz grafikas noformējumā. Aprēķinus izdara, kā aprakstīts turpmāk.

Testa nolūkiem uzskata, ka 1 cm^3 ūdens šķīduma masa ir 1 g. Augsnes/šķīduma attiecību svars/svars vai svars/tilpums vienībās var izteikt ar vienu un to pašu skaitli.

2.1. ADSORBCIJA

Adsorbciju A_{t_i} definē kā vielas, kas adsorbēta uz augsnes, procentuālo daudzumu attiecībā pret testa sākumā klātesošo vielas daudzumu testa apstākļos. Ja testa viela ir stabila un ievērojamā mērā neadsorbējas uz trauka sienām, A_{t_i} aprēķina katrā laika punktā t_i saskaņā ar vienādojumu:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

kur:

A_{t_i} = adsorbcijas procentuālais daudzums laika punktā t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = uz augsnes adsorbētās testa vielas masa laika punktā t_i (μg),

m_0 = testa vielas masa mēģenē testa sākumā (μg).

Sīkāk izstrādāta informācija, kā aprēķināt adsorbcijas procentuālo daudzumu A_{t_i} paralēlajai un virknes metodei, ir dota 5. papildinājumā.

Sadalījuma koeficients K_d ir attiecība starp vielas saturu augsnes fāzē un vielas masas koncentrāciju ūdens šķīdumā testa apstākļos, kad sasniegts adsorbcijas līdzsvars.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

kur:

$C_s^{ads}(eq)$ = uz augsnes adsorbētās vielas saturs adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = vielas masas koncentrācija ūdens fāzē adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg cm^{-3}). Koncentrāciju analītiski nosaka, ņemot vērā tukšajos mēģinājumos iegūtos lielumus;

$m_s^{ads}(eq)$ = uz augsnes adsorbētās vielas masa adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = vielas masa šķīdumā adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg),

m_{soil} = augsnes fāzes daudzums, izteikts kā augsnes sausā masa (g),

V_0 = ūdens fāzes sākotnējais tilpums (cm^3), kas saskaras ar augsni.

Sakarību starp A_{eq} un K_d izrēķina no vienādojuma:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

kur:

A_{eq} = adsorbcijas procentuālais daudzums adsorbcijas līdzsvara stāvoklī %.

Organiskā oglekļa normalizētais adsorbcijas koeficients K_{oc} saista sadalījuma koeficientu K_d ar organiskā oglekļa saturu augsnes paraugā

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

kur:

%OC = organiskā oglekļa procentuālais daudzums augsnes paraugā (g g^{-1}).

Koeficients K_{oc} ir vienīgas lielums, kas raksturo galvenokārt nepolāru organisko ķimikāliju sadalījumu starp organisko oglekli augsnē vai nogulumos un ūdenī. Šo ķimikāliju adsorbcijas korelē ar sorbējošās cietās vielas organisko vielu saturu (7); tādējādi K_{oc} lielumi ir atkarīgi no specifiskajām īpašībām, kas piemīt humusa frakcijām, kuru sorbcijas spēja izcelsmes, izveidošanās u. c. atšķirību dēļ ir ievērojami atšķirīga.

2.1.1. **Adsorbcijas izotermas**

Freindliha adsorbcijas izotermas vienādojums saista testa vielas adsorbēto daudzumu ar testa vielas koncentrāciju šķīdumā līdzsvara stāvoklī (8. vienādojums).

Datus apstrādā, kā aprakstīts iedaļā "Adsorbcija", un katrai mēģenei aprēķina testa vielas daudzumu, kas adsorbēts uz augsnes pēc adsorbcijas testa ($C_s^{ads}(eq)$, citur apzīmēts kā x/m). Pieņem, ka līdzsvars ir sasniegts un ka $C_s^{ads}(eq)$ ir lielums līdzsvara stāvoklī:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freindliha adsorbcijas vienādojums ir 8. vienādojums:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

vai lineārā veidā:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

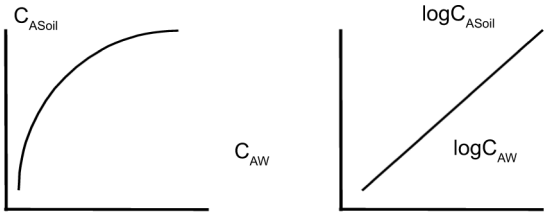
kur:

K_F^{ads} = Freindliha adsorbcijas koeficients; tā dimensija ir $cm^3\ g^{-1}$ tikai, ja 1/n = 1; visos citos gadījumos dimensijā K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}) ieved slīpumu 1/n,

n = regresijas konstante; 1/n parasti ir diapazonā no 0,7 līdz 1,0, kas norāda, ka sorbcijas dati bieži ir nedaudz nelineāri.

8. un 9. vienādojumu attēlo grafiski un, izmantojot 9. vienādojumu, ar regresijas analīzi aprēķina K_F^{ads} un 1/n lielumus. Aprēķina arī logaritmiskā vienādojuma korelācijas koeficientu r^2. Šāda grafiskā attēlojuma piemēri ir doti 2. attēlā.

▼B



2. attēls. Freindliha adsorbcijas grafiskais attēls, parastais un linearizētais

2.1.2. **Masas bilance**

Masas bilanci (MB) definē kā vielas procentuālo daudzumu, ko var analītiski atgūt pēc adsorbcijas testa, attiecībā pret vielas nominālo daudzumu testa sākumā.

Datu apstrāde ir atšķirīga, ja šķīdinātājs pilnībā jaucas ar ūdeni. Ja šķīdinātājs jaucas ar ūdeni, var izmantot datu apstrādi, kas aprakstīta iedaļā "Desorbcija", lai noteiktu ar šķīdinātāja ekstrahēšanu atgūto vielas daudzumu. Ja šķīdinātājs mazāk jaucas ar ūdeni, atgūtais daudzums ir jānosaka.

Adsorbcijas masas bilanci MB aprēķina šādi: pieņem, ka apzīmējums (mE) atbilst no augsnes un no testa trauka virsmas ar organisko šķīdinātāju ekstrahētās testa ķimikālijas masu summai

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

kur:

MB = masas bilance (%),

m_E = testa vielas kopējā masa, kas ekstrahēta no augsnes un no testa trauka sienām divos posmos (μg),

C_0 = testa šķīduma, kas saskaras ar augsni, sākotnējā masas koncentrācija (μg cm^{-3}),

V_{rec} = pēc adsorbcijas līdzsvara iestāšanās atgūtais supernatanta tilpums (cm^{-3}).

2.2. DESORBCIJA

Desorbcija (D) definēta kā desorbētais testa vielas procentuālais daudzums attiecībā pret iepriekš adsorbēto vielas daudzumu testa apstākļos:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

kur:

D_{t_i} = desorbcijas procentuālais daudzums laika punktā t_i (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = no augsnes desorbētās testa vielas masa laika punktā t_i (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = no augsnes desorbētās vielas masa adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg).

Sīkāk izstrādāta informācija, kā aprēķināt desorbcijas procentuālo daudzumu D_{t_i} paralēlajai un virknes metodei, ir dota 5. papildinājumā.

Šķietamais desorbcijas koeficients K_{des} ir attiecība starp augsnes fāzē palikušās vielas saturu un desorbētās vielas masas koncentrāciju ūdens šķīdumā, kad sasniegts desorbcijas līdzsvars:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

kur:

K_{des} = desorbcijas koeficients ($cm^3\ g^{-1}$),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = no augsnes desorbētās testa vielas kopējā masa desorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg),

V_T = kopējais tilpums ūdens fāzei, kas desorbcijas kinētikas testa laikā saskaras ar augsni (cm^3).

Pamatnostādnes $m_{aq}^{des}(eq)$ aprēķināšanai ir dotas 5. papildinājumā iedaļā "Desorbcija".

Piezīme

Ja iepriekš izdarītais adsorbcijas tests ir bijis veikts ar paralēlo metodi, uzskata, ka 12. vienādojumā tilpums VT ir vienāds ar V_0.

2.2.1. **Desorbcijas izotermas**

Freindliha desorbcijas izotermas vienādojums saista testa vielas daudzumu, kas palicis adsorbēts uz augsnes, ar testa vielas koncentrāciju šķīdumā desorbcijas līdzsvara stāvoklī (16. vienādojums).

Katrai mēģenei vielas saturu, kas palicis adsorbēts uz augsnes desorbcijas līdzsvara stāvoklī, aprēķina šādi:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ definē kā:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

kur:

$C_s^{des}(eq)$ = testa vielas saturs, kas palicis adsorbēts uz augsnes desorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg g^{-1}),

$m_m^{des}(eq)$ = analītiski noteiktā vielas masa ūdens fāzē desorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg),

▼B

m_{aq}^{A} = testa vielas masa, kas palikusi pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas nepilnīgas tilpuma aizstāšanas dēļ (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = vielas masa šķīdumā adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = šķīduma tilpums, kas ņemts no mēģenes testa vielas mērījumam desorbcijas līdzsvara stāvoklī (cm^3),

V_R = supernatanta tilpums, kas aizvadīts no mēģenes pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas un aizvietots ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ tilpumu (cm^3);

Freindliha desorbcijas vienādojums ir 16. vienādojums:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

vai lineārā veidā:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

kur:

K_F^{des} = Freindliha desorbcijas koeficients,

n = regresijas konstante,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = vielas masas koncentrācija ūdens fāzē desorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg cm^{-3}).

16. un 17. vienādojumu var attēlot grafikā un, izmantojot 17. vienādojumu, ar regresijas analīzi aprēķināt $K_F{}^{des}$un 1/n lielumu.

Piezīme

Ja Freindliha adsorbcijas vai desorbcijas pakāpes rādītājs 1/n ir vienāds ar 1, Freindliha adsorbcijas vai desorbcijas konstante (K_F^{ads} un K_F^{des}) ir attiecīgi vienāda ar adsorbcijas vai desorbcijas līdzsvara konstantēm (K_d un K_{des}) un C_s sakarība ar C_{aq} ir lineāra. Ja pakāpes rādītāji nav vienādi ar 1, C_s sakarība ar C_{aq} nav lineāra un adsorbcijas un desorbcijas konstantes izotermās mainās.

2.2.2. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā ir šāda informācija:

— Izmantoto augsnes paraugu pilnīga identifikācija, kurā iekļauta:

— ģeogrāfiskā vietas norāde (ģeogrāfiskais platums un garums),

— paraugu ņemšanas datums,

▼B

— izmantošanas veids (piemēram, lauksaimniecības augsne, meža augsne utt.),

— parauga ņemšanas dziļums,

— smilts/sanesu/mālu saturs,

— pH lielumi (0,01 M $CaCl_2$ šķīdumā),

— organiskā oglekļa saturs,

— organiskās vielas saturs,

— slāpekļa saturs,

— C/N attiecība,

— katjonu apmaiņas spēja (mmoli/kg),

— visa informācija attiecībā uz augsnes paraugu savākšanu un uzglabāšanu,

— attiecīgā gadījumā – visa informācija, kas attiecas uz testa vielas adsorbcijas/desorbcijas interpretāciju,

— uz metodēm, kas izmantotas katra parametra noteikšanai,

— attiecīgā informācija par testa vielu,

— eksperimenta temperatūra,

— centrifugēšanas apstākļi,

— testa vielas analīzē izmantotā analītiskā procedūra,

— šķīdību palielinoša reaģenta izmantošanas pamatojums testa vielas izejas šķīduma pagatavošanai,

— attiecīgā gadījumā aprēķinos izdarīto korekciju izskaidrojums,

— dati saskaņā ar veidlapu (6. papildinājums) un grafiskais attēlojums,

— visa informācija un novērojumi, kas ir noderīgi testa rezultātu interpretācijai.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, 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, 0PPTS 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, p. 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, p. 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), p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 961–971.

(25) Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, p. 247–258.

(26) Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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), p. 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, p. 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, p. 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, p.80–101,

(36) Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, p. 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, p. 667–668.

(38) Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, p. 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, p. 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, p. 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, p. 29–92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, p. 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, p. 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, p. 49–143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". Weed Science, Vol. 23, p. 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 run-off 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, p. 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., p. 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, p. 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, p. 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), p. 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), p. 227–231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), p. 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), p. 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, p. 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, p. 38–42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), “Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), p. 833–846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), “Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité. Revue de l’Agric., 34 (4), p. 319–322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), “Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), p. 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), p. 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), p. 2341–2352.

(77) Hance, R.J., (1967), “The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, p. 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, p.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, p. 14–32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), “Studies in adsorption: XI. 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., p. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), “Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l’adsorption”. Ann. Agron. 31, p. 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, U.K.

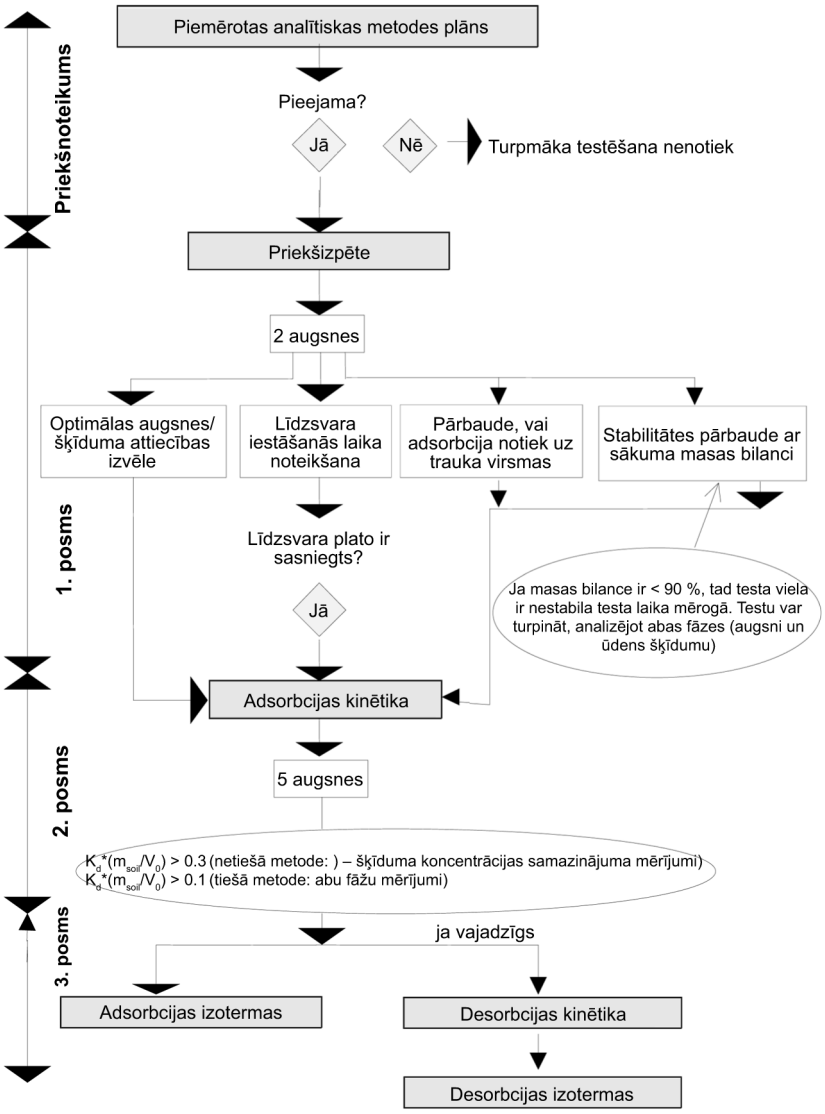
(84) Guth, J.A., (1985), “Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

(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. PAPILDINĀJUMS

Testēšanas shēma



▼B

2. PAPILDINĀJUMS

KONCENTRĀCIJAS MAIŅAS UN ANALĪTISKĀS METODES PRECIZITĀTES IETEKME UZ ADSORBCIJAS REZULTĀTU PRECIZITĀTI

No turpmāk dotās tabulas (84) ir redzams – ja starpība starp testa vielas sākuma masu šķīdumā (m_0 = 110 µg) un līdzsvara stāvokļa masu šķīdumā ($m_{aq}^{ads}(eq)$=100 µg) ir ļoti maza, tad 5 % kļūda līdzsvara stāvokļa koncentrācijas mērījumā rada 50 % kļūdu uz augsnes adsorbētās vielas masas ($m_s^{ads}(eq)$) aprēķinā un 52,4 % kļūdu K_d aprēķinā.

Augsnes daudzums m_{soil} = 10 g

Šķīduma tilpums 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 vai C_0=1.100 µg/cm^3	**A = 9 %**							
	100	1,000	patiesais lielums	10	1,00	patiesais lielums	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 vai C_0=1.100µg/cm^3	**A = 55 %**							
	50,0	0,500	patiesais lielums	60,0	6,00	patiesais lielums	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 vai C_0=1.100 µg/cm^3	**A = 99 %**							
	1,100	0,011	patiesais lielums	108,9	10,89	patiesais lielums	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 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}. \; Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = testa vielas masa augsnes fāzē līdzsvara stāvoklī, µg,

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = testa vielas masa ūdens fāzē līdzsvara stāvoklī, µg,

$C_s^{ads}(eq)$ = testa vielas saturs augsnes fāzē līdzsvara stāvoklī, µg g^{-1},

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testa vielas masas koncentrācija ūdens fāzē līdzsvara stāvoklī, µg cm^{-3},

R = $m_{aq}^{ads}(eq)$ noteikšanas analītiskā kļūda,

R‡ = aprēķina kļūda, kas radusies analītiskās kļūdas R dēļ.

▼B

3. PAPILDINĀJUMS

K_D NOVĒRTĒŠANAS METODES

1. Novērtēšanas metodes ļauj paredzēt K_d, pamatojoties uz korelācijām, piemēram, ar P_{ow} lielumiem (12) (39) (63)–(68), šķīdības ūdenī datiem (12) (19) (21) (39) (68)–(73) vai polaritātes datiem, kas iegūti, izmantojot apgrieztās fāzes HPLC (74)–(76). Kā parādīts 1. un 2. tabulā, K_{oc} vai K_{om} aprēķina no šiem vienādojumiem, un pēc tam netieši aprēķina K_d no šādiem vienādojumiem:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou}\ (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\ (cm^3 g^{-1})$$

2. Šīs korelācijas pamatojas uz diviem pieņēmumiem: 1) tieši augsnes organiskās sastāvdaļas visvairāk ietekmē vielas adsorbciju; un 2) iesaistītās savstarpējās iedarbības galvenokārt ir nepolāras. Tādēļ attiecīgās korelācijas: 1) nav piemērojamas polārām vielām vai ir tām piemērojamas tikai kaut kādā mērā un 2) nav piemērojamas, ja organisko sastāvdaļu saturs augsnē ir ļoti mazs (12). Turklāt, kaut arī ir atrastas apmierinošas korelācijas starp P_{ow} un adsorbciju (19), to pašu nevar teikt par sakarību starp šķīdību ūdenī un adsorbciju (19) (21); pagaidām pētījumi ir ļoti pretrunīgi.

3. Daži korelāciju piemēri starp adsorbcijas koeficientu un sadalījuma koeficientu sistēmā oktanols–ūdens, kā arī starp adsorbcijas koeficientu un šķīdību ūdenī ir sniegti attiecīgi 1. un 2. tabulā.

1. tabula

Korelāciju piemēri starp adsorbcijas sadalījuma koeficientu un sadalījuma koeficientu sistēmā oktanols–ūdens; citus piemērus skatīt (12), (68).

Vielas	Korelācijas	Autori
Urīnvielas atvasinājumi	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Hlorētie aromātiskie savienojumi	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Dažādi pesticīdi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromātiskie ogļūdeņraži	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

2. tabula

Korelāciju piemēri starp adsorbcijas sadalījuma koeficientu un šķīdību ūdenī; citus piemērus skatīt (68), (69).

Savienojumi	Korelācijas	Autori
Dažādi pesticīdi	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Hlorētas alifātiskās un aromātiskās vielas	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) – (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftols	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cikliskas alifātiskās un aromātiskās vielas	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Dažādi savienojumi	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

4. PAPILDINĀJUMS

APRĒĶINI CENTRIFUGĒŠANAS APSTĀKĻU DEFINĒŠANAI

1. Centrifugēšanas laiku apraksta šāda formula, pieņemot, ka daļiņas ir lodveida:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Vienkāršības labad visi parametri ir aprakstīti vienībās, kas nav SI vienības (g, cm),

kur:

ω = griešanās ātrums (=2 π rpm/60), rad s^{-1},

rpm = apgriezieni minūtē,

η = šķīduma viskozitāte, g s^{-1} cm^{-1},

r_p = daļiņas rādiuss, cm,

ρ_s = augsnes blīvums, g cm^{-3},

ρ_{aq} = šķīdums blīvums, g cm^{-3},

R_t = atstatums no centrifūgas rotora centra līdz šķīduma augšpusei centrifūgas mēģenē, cm,

R_b = atstatums no centrifūgas rotora centra līdz šķīduma apakšai centrifūgas mēģenē, cm,

R_b-R_t = augsnes/šķīduma maisījuma augstums centrifūgas mēģenē, cm.

Lai nodrošinātu pilnīgu atdalīšanu, parasti izmanto divreiz ilgāku laiku nekā aprēķinātais.

2. Vienādojumu (1) var vēl vairāk vienkāršot, ja uzskata, ka šķīduma viskozitāte (η) un blīvums (ρ_{aq}) ir vienāds ar ūdens viskozitāti un blīvumu 25 °C temperatūrā; tā, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} un $\rho_{aq} = 1{,}0$ g × cm^{-3}.

Tātad centrifugēšanas laiku apraksta vienādojums (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. No 2. vienādojuma ir redzams, ka centrifugēšanas apstākļu noteikšanā ir svarīgi divi parametri, t. i., laiks (t) un ātrums (apgr. min), lai sasniegtu daļiņu atdalīšanu ar konkrētu lielumu (mūsu gadījumā ar rādiusu 0,1 μm): 1) augsnes blīvums un 2) maisījuma augstums centrifūgas mēģenē (R_b-R_t), t. i., atstatums, ko aizņem augsnes daļiņas no šķīduma virsmas līdz mēģenes apakšai; acīmredzot, ja tilpums ir nemainīgs, maisījuma augstums mēģenē ir atkarīgs no mēģenes rādiusa kvadrāta.

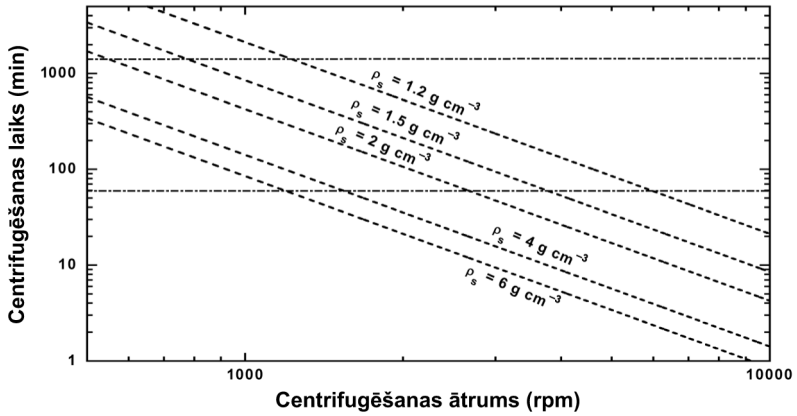
4. Šā papildinājuma 1. attēlā attēlotas centrifugēšanas laika (t) pārmaiņas atkarībā no centrifugēšanas ātruma (apgr. min) dažādiem augsnes blīvumiem (ρ_s) (1.a attēls) un atkarībā no maisījuma augstuma centrifūgas mēģenēs (1.b attēls). 1.a attēlā ir acīmredzama augsnes blīvuma ietekme; piemēram, klasiskai centrifugēšanai ar 3000 apgr. min centrifugēšanas laiks ir aptuveni 240 min, ja augsnes blīvums ir 1,2 g cm^3, bet tas ir tikai 50 min, ja augsnes blīvums ir 2,0 g cm^3. Līdzīgi 1.b attēlā klasiskai centrifugēšanai ar 3000 apgr. min centrifugēšanas laiks ir aptuveni 50 min, ja maisījuma augstums ir 10 cm, un tikai 7 min, ja augstums ir 1 cm. Tomēr ir svarīgi atrast optimālu attiecību starp centrifugēšanu, kurai vajadzīgs iespējami mazāks augstums, un starp vieglāku eksperimentatora darbu, atdalot fāzes pēc centrifugēšanas.

▼B

5. Turklāt, nosakot eksperimenta apstākļus augsnes/šķīduma fāzu atdalīšanai, ir svarīgi ņemt vērā iespējamo trešās "pseidofāzes" – koloīdu – pastāvēšanu. Koloidālajām daļiņām, kuru lielums ir mazāks par 0,2 μm, var būt svarīga ietekme uz visu vielas adsorbcijas mehānismu augsnes suspensijā. Ja centrifugēšanu izdara, kā iepriekš aprakstīts, koloidālās daļiņas paliek ūdens fāzē un tās tiek pakļautas analīzei kopā ar ūdens fāzi. Tādā veidā informācija par to ietekmi ir zaudēta.

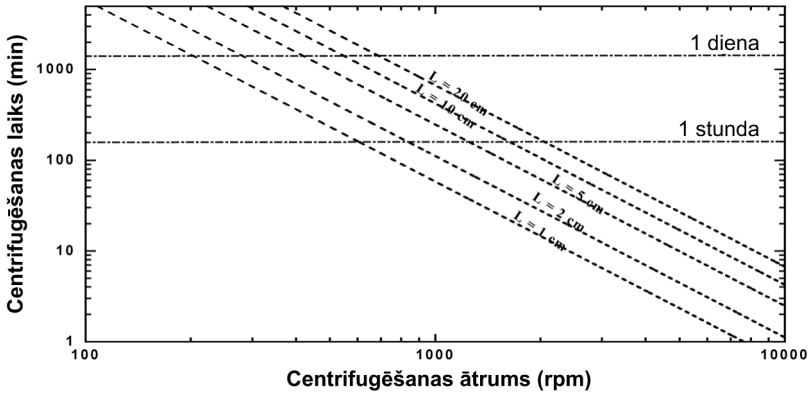
Ja analīžu izdarītājai laboratorijai ir ultracentrifugēšanas vai ultrafiltrēšanas iekārtas, vielas adsorbciju/desorbciju uz augsnes var pētīt dziļāk, iekļaujot arī informāciju par vielas adsorbciju uz koloidālām daļiņām. Tādā gadījumā, lai atdalītu visas trīs fāzes, jāizmanto ultracentrifugēšana ar 60 000 apgr. min vai ultrafiltrēšana ar filtra porainību 100 000 daltoni. Attiecīgi ir arī jāmaina testa ziņojums, lai visās trīs fāzēs izdarītu vielas analīzi.

1.a attēls.



Centrifugēšanas laika (t) pārmaiņas atkarībā un centrifugēšanas ātruma (apgr. min) dažādiem augsnes blīvumiem (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} un ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} pie 25 °C.

1.b attēls.



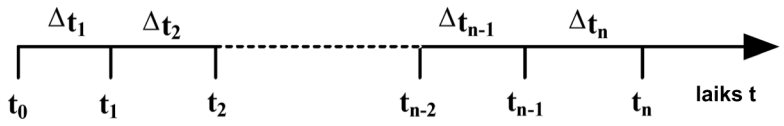
Centrifugēšanas laika (t) pārmaiņas atkarībā no centrifugēšanas ātruma (apgr. min) dažādiem maisījuma augstumiem centrifūgas mēģenē (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} pie 25 °C un ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

5. PAPILDINĀJUMS

ADSORBCIJAS A (%) UN DESORBCIJAS D (%) APRĒĶINS

Procedūras laika grafiks ir:



Visos aprēķinos ir pieņemts, ka testa viela ir stabila un ievērojami neadsorbējas uz trauka sienām.

ADSORBCIJA A (A %)

a) *Paralēlā metode*

Adsorbcijas procentuālo daudzumu aprēķina katrai mēģenei (i) katrā laika punktā (t_i) saskaņā ar vienādojumu:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Šā vienādojuma locekļus var aprēķināt šādi:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kur:

A_{ti} = adsorbcijas procentuālais daudzums (%) laika punktā t_i,

$m_s^{ads}(t_i)$ = uz augsnes adsorbētās testa vielas masa analīzes izdarīšanas laika punktā (μg),

m_0 = testa vielas masa mēģenē testa sākumā (μg),

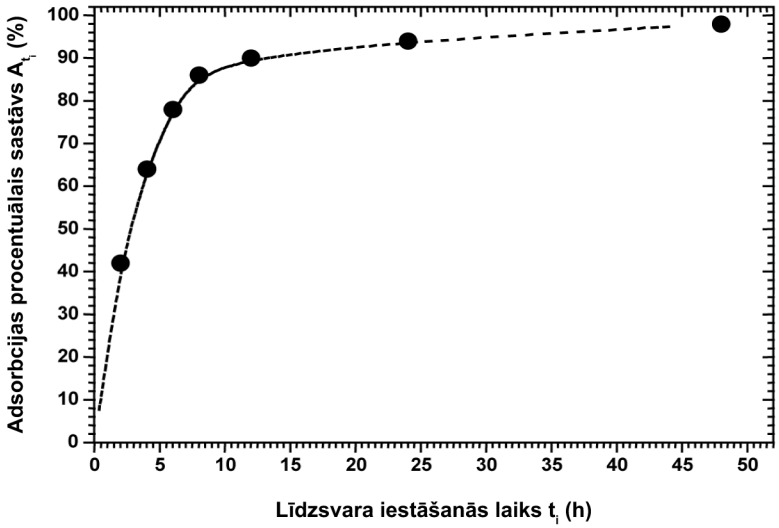
C_0 = ar augsni saskarē esošā testa šķīduma sākotnējā masas koncentrācija (μg cm^{-3}),

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = vielas masas koncentrācija ūdens fāzē analīzes izdarīšanas laika punktā t_i (μg cm^{-3}); šo koncentrāciju analītiski nosaka, ņemot vērā tukšajos mēģinājumos iegūtos lielumus,

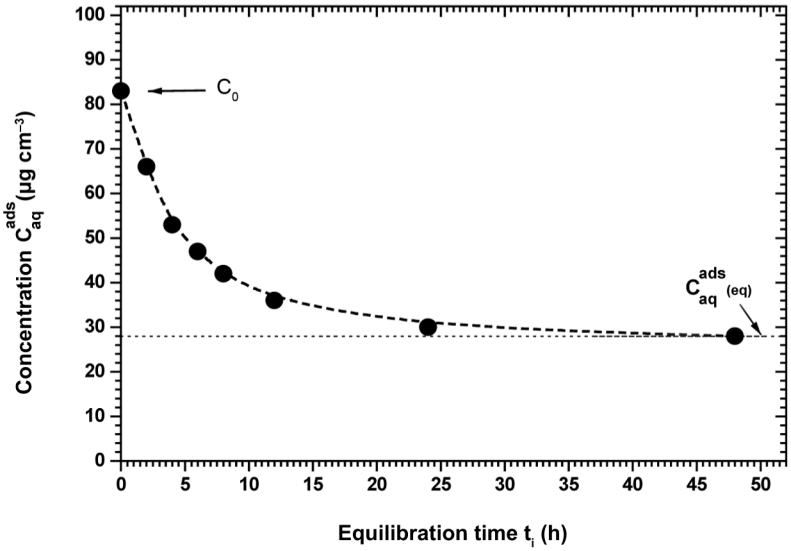
V_0 = ar augsni saskarē esošā testa šķīduma ūdens fāzes sākotnējais tilpums (cm^3).

Adsorbcijas procentuālā daudzuma A_{t_i} vai $C_{aq}^{ads}(t_i)$ lielumus atliek grafiski atkarībā no laika un nosaka laiku, kad ir sasniegts sorbcijas līdzsvars. Šādu grafiku piemēri attiecīgi ir doti 1. un 2. attēlā.



1. attēls.

Adsorbcijas līdzsvara grafiks.



2. attēls.

Testa vielas masas koncentrācija ūdens fāzē (C_{aq}) atkarībā no laika.

▼B

b) *Virknes metode*

Turpmāk dotie vienādojumi ņem vērā, ka adsorbcijas procedūru izdara, noteiktos laika intervālos mērot testa vielu mazos ūdens fāzes alikvotos.

— Uz augsnes katrā laika intervālā adsorbēto vielas daudzumu aprēķina šādi:

— pirmajam laika intervālam $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— otrajam laika intervālam Dt2 = t2- t1

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— trešajam laika intervālam Dt3 = 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-tajam laika intervālam Dtn = tn- tn-1

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1)\, v_a^A\right)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorbcijas procentuālo daudzumu katrā laika intervālā $A_{\Delta t_i}$ aprēķina, izmantojot šādu vienādojumu:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

kur adsorbcijas procentuālo daudzumu A_{t_i} laika punktā t_i apraksta vienādojums:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorbcijas procentuālā daudzuma A_{t_i} vai $A_{\Delta t_i}$ (atkarībā no pētījuma vajadzībām) lielumus atliek grafiski atkarībā no laika un nosaka laiku, kad ir sasniegts sorbcijas līdzsvars.

— Līdzsvara sasniegšanas laikā t_{eq}:

— uz augsnes adsorbētās testa vielas masa ir:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— testa vielas masa šķīdumā ir

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— un adsorbcijas procentuālais daudzums līdzsvara stāvoklī ir:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Iepriekš izmantotie parametri ir definēti kā:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = vielas masa, kas attiecīgi adsorbēta uz augsnes laika intervālos Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} (mg),

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = vielas masa, kas attiecīgi izmērīta alikvotā v_a^A laika punktos t_1, t_2, t_n (mg),

$m_s^{ads}(eq)$ = uz augsnes adsorbētās vielas masa adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (mg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = vielas masa šķīdumā adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (mg),

v_a^A = alikvota tilpums, kurā mēra testa vielu (cm^3),

$A_{\Delta ti}$ = adsorbcijas procentuālais daudzums, kas atbilst laika intervālam Δt_i (%),

A_{eq} = adsorbcijas procentuālais daudzums adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (%).

DESORBCIJA D (%)

Par laiku t_0, kad sākas desorbcijas kinētikas eksperiments, uzskata mirkli, kad testa vielas šķīduma maksimālais atgūtais tilpums (pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas) ir aizvietots ar vienādu 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpumu.

a) *Paralēlā metode*

Laika punktā ti mēra testa vielu ūdens fāzē, kas ņemta no i-tās mēģenes (V_r^i), un desorbēto masu aprēķina saskaņā ar vienādojumu:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Desorbcijas līdzsvara stāvoklī $t_i = t_{eq}$ Laika intervālā $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

(Δt_i) desorbēto testa vielas masu apraksta vienādojums:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Aprēķina desorbcijas procentuālo daudzumu:

laika punktā t_i no vienādojuma:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

un laika intervālā (Δt_i) no vienādojuma:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

kur:

D_{ti} = desorbcijas procentuālais daudzums laika punktā$_i$ (%),

$D_{\Delta ti}$ = desorbcijas procentuālais daudzums, kas atbilst laika intervālam Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = desorbētās testa vielas masa laika punktā t_i, (μg)),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = desorbētās testa vielas masa laika intervālā Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = testa vielas masa, kas analītiski izmērīta laika punktā t_i analīzei ņemtā šķīduma tilpumā $V_r^{\ i}$ (μg),

m_{aq}^{A} = testa vielas masa, kas palikusi pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas nepilnīgas tilpuma aizvietošanas dēļ (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = testa vielas masa šķīdumā adsorbcijas līdzsvara stāvoklī (μg),

V_R = supernatanta tilpums, kas aizvadīts no mēģenes pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas un aizvietots ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ tilpumu (cm^3),

$V_r^{\ i}$ = šķīduma tilpums, kas ņemts no i-tās mēģenes testa vielas mērījumam desorbcijas kinētikas eksperimentā (cm^3).

Desorbcijas procentuālā daudzuma D_{ti} vai $D_{\Delta t_i}$ (atkarībā no pētījuma vajadzībām) lielumus atliek grafiski atkarībā no laika un nosaka laiku, kad ir sasniegts desorbcijas līdzsvars.

b) **Virknes metode**

Turpmāk dotajos vienādojumos ir ņemts vērā, ka adsorbcijas procedūra, kas ir veikta iepriekš, ir izdarīta, mērot testa vielu mazos ūdens fāzes alikvotos (v_a^A) (virknes metode 1.9. punktā "Testa izpildīšana"). Pieņem, ka: a) supernatanta tilpums, kas no mēģenes aizvadīts pēc adsorbcijas kinētikas eksperimenta, ir aizvietots ar tādu pašu 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpumu (V_R) un b) ar augsni saskarē esošas ūdens fāzes tilpums (V_T) desorbcijas kinētikas eksperimentā paliek nemainīgs, un to apraksta vienādojums:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

Laika punktā t_i:

— testa vielas masu mēra mazā alikvotā $\left(v_a^D\right)$ un desorbēto masu aprēķina saskaņā ar vienādojumu:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Desorbcijas līdzsvara stāvoklī $t_i = t_{eq}$ un tādēļ $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Desorbcijas procentuālo daudzumu D_{t_i} aprēķina no šāda vienādojuma:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Laika intervālā (Δt_i):

Katrā laika intervālā desorbēto vielas daudzumu aprēķina šādi:

— pirmajam laika intervālam $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— otrajam laika intervālam $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \text{ un} \quad (22)$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— n-tajam intervālam $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

και (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Visbeidzot, desorbcijas procentuālo daudzumu katrā laika intervālā $D_{\Delta t_i}$ aprēķina, izmantojot šādu vienādojumu:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

bet desorbcijas procentuālo daudzumu D_{t_i} laika punktā t_i apraksta vienādojums:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

kur iepriekš izmantotie parametri ir definēti kā:

$m^{des}{}_s(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_s(\Delta t_n)$ = vielas masa, kas palikusi adsorbēta uz augsnes attiecīgi pēc laika intervāliem Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg),

$m^{des}{}_{aq}(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_{aq}(\Delta t_n)$ = vielas masa, kas attiecīgi desorbēta laika intervālos Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg),

$m^{des}{}_m(t_1)$, $m^{des}{}_m(t_2)$,... , $m^{des}{}_m(t_n)$ = vielas masa, kas attiecīgi izmērīta alikvotā (v_a^D) laika punktos t_1,t_2,..., t_n, (μg),

V_T = tilpums ūdens fāzei, kas saskaras ar augsni desorbcijas kinētikas eksperimentā, kuru izdara ar virknes metodi (cm^3),

m_{aq}^A = testa vielas masa, kas palikusi pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas nepilnīgas tilpuma aizvietošanas dēļ (μg),

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = supernatanta tilpums, kas aizvadīts no mēģenes pēc adsorbcijas līdzsvara sasniegšanas un aizvietots ar to pašu 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpumu (cm^3),

v_a^D = alikvota tilpums, kas desorbcijas kinētikas eksperimentā, kuru izdara ar virknes metodi, ņemts analīzei no i-tās mēģenes (cm^3),

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

6. PAPILDINĀJUMS

ADSORBCIJA/DESORBCIJA UZ AUGSNES: DATU NOFORMĒŠANAS PROTOKOLI

Testētā viela:

Testētā augsne:

Sausās masas saturs augsnē (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatūra: .....°C

Analītiskās metodes piemērotība

Nosvērtā augsne	g	
Augsne: sausā masa	g	
$CaCl_2$ šķīduma tilpums	cm^3	
Gala šķīduma nominālā koncentrācija	$\mu g\ cm^{-3}$	
Gala šķīduma analītiskā koncentrācija	$\mu g\ cm^{-3}$	

Izmantotās analītiskās metodes princips:

Analītiskās metodes kalibrēšana:

Testētā viela:

Testētā augsne:

Augsnes sausās masas saturs (105 °C, 12 h): .....c %

Temperatūra: .....°C

Izmantotā analītiskā metodika: Netiešā ☐ Paralēlā ☐ Virknes ☐

Tiešā ☐

Adsorbcijas tests: testa paraugi

	Simbols	Vienības	Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks	
Mēģenes nr.										
Nosvērtā augsne	—	g								
Augsne: sausā masa	m_{soil}	g								
Ūdens tilpums nosvērtajā augsnē (aprēķinātais)	V_{WS}	cm^3								
0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpums līdzsvara stāvokļa sasniegšanai augsnē		cm^3								
Izejas šķīduma tilpums		cm^3								
Kopējais tilpums ūdens fāzei, kas ir saskarē ar augsni	V_0	cm^3								
Testa šķīduma sākotnējā koncentrācija	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Testa vielas masa testa sākumā	m_o	µg								

▼B

	Simbols	Vienības	Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks		Līdzsvara iestāšanās laiks	
Pēc kratīšanas un centrifugēšanas										
NETIEŠĀ METODE										
Paralēlā metode										
Testa vielas koncentrācija ūdens fāzē, iekļaujot korekciju uz tukšo mēģinājumu	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm-^{3}								
Virknes metode										
Testa vielas izmērītā masa alikvotā V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
TIEŠĀ METODE										
Uz augsnes adsorbētā testa vielas masa	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorbcijas aprēķins										
Adsorbcija	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Vidējā										
Adsorbcijas koeficients	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Vidējais										
Adsorbcijas koeficients	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Vidējais										

Testētā viela:

Testētā augsne:

Augsnes sausās masas saturs (105 ..... %

Temperatūra: .....°C

Adsorbcijas tests: tukšais mēģinājums un kontroles mēģinājums

	Simbols	Vienības	Tukšais mēģinājums		Tukšais mēģinājums		Kontroles mēģinājums	
Mēģenes nr.								
Nosvērtā augsne		g					0	0
Ūdens daudzums nosvērtajā augsnē (aprēķinātais)		cm^3					—	—
Pievienotais 0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpums		cm^3						
Pievienotais testa vielas izejas šķīduma tilpums		cm^3	0	0				
Kopējais ūdens fāzes tilpums (aprēķinātais)		cm^3					—	—

▼B

	Simbols	Vienības	Tukšais mēģinājums		Tukšais mēģinājums		Kontroles mēģinājums	
Testa vielas sākotnējā koncentrācija ūdens fāzē		µg cm-^{3}						

Pēc kratīšanas un centrifugēšanas

Koncentrācija ūdens fāzē		µg cm-^{3}						

Piezīme: vajadzības gadījumā pievienojiet ailes.

Testētā viela:

Testētā augsne:

Augsnes sausās masas saturs (105 ^oC 12 h): ..... %

Temperatūra: .....^oC

Masas bilance

	Simbols	Vienības				
Mēģenes nr.						
Nosvērtā augsne	—	g				
Augsne: sausā masa	ms_{oil}	g				
Ūdens tilpums nosvērtajā augsnē (aprēķinātais)	V_{WS}	ml				
0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpums līdzsvara stāvokļa sasniegšanai augsnē		ml				
Izejas šķīduma tilpums		cm^3				
Kopējais tilpums ūdens fāzei, kas ir saskarē ar augsni	V_0	cm^3				
Testa šķīduma sākotnējā koncentrācija	C_0	µg cm-^{3}				
Līdzsvara iestāšanās laiks	—	h				

Pēc kratīšanas un centrifugēšanas

Testa vielas koncentrācija ūdens fāzē pie adsorbcijas, iekļaujot korekciju uz tukšo mēģinājumu līdzsvara stāvoklī	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm-^{3}				
Līdzsvara sasniegšanas laiks	t_{eq}	h				

1. atšķaidījums ar šķīdinātāju

Aizvadītais ūdens fāzes tilpums	V_{rec}	cm^3				
Pievienotais šķīdinātāja tilpums	ΔV	cm^3				

1. ekstrakcija ar šķīdinātāju

Šķīdinātājā analizētais signāls	S_{E1}	var.				
Testa vielas koncentrācija šķīdinātājā	C_{E1}	µg cm-^{3}				

▼B

	Simbols	Vienības				
No augsnes un no trauka sienām ekstrahētā vielas masa	m_{E1}	µg				
2. atšķaidījums ar šķīdinātāju						
Aizvadītais šķīdinātāja tilpums	ΔV_s	cm^3				
Pievienotais šķīdinātāja tilpums	$\Delta V'$	cm^3				
2. ekstrakcija ar šķīdinātāju						
Šķīdinātāja fāzē analizētais signāls	S_{E2}	var.				
Testa vielas koncentrācija šķīdinātājā	C_{E2}	µg cm^{-3}				
No augsnes un no trauka sienām ekstrahētā vielas masa	m_{E2}	µg				
Divos posmos ekstrahētā kopējā testa vielas masa	m_E	µg				
Masas bilance	MB	%				

Testētā viela:

Testētā augsne:

Augsnes sausās masas saturs (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatūra: ..... °C

Adsorbcijas izotermas

	Simbols	Vienības								
Mēģene nr.										
Nosvērtā augsne	—	g								
Augsne: sausā masa	E	g								
Ūdens tilpums nosvērtajā augsnē (aprēķinātais)	V_{WS}	cm^3								
0,01 M $CaCl_2$ šķīduma tilpums līdzsvara stāvokļa sasniegšanai augsnē		cm^3								
Pievienotais izejas šķīduma tilpums		cm^3								
Kopējais tilpums ūdens fāzei, kas ir saskarē ar augsni (aprēķinātais)	V_0	cm^3								
Šķīduma koncentrācija	C_0	µg cm^{-3}								
Līdzsvara sasniegšanas laiks	—	h								

▼B

	Simbols	Vienības								
Pēc kratīšanas un centrifugēšanas										
Vielas koncentrācija ūdens fāzē, iekļaujot korekciju uz tukšo mēģinājumu	$C_s^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatūra		^oC								
Uz augsnes vienību adsorbētā masa	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regresijas analīze:

lielums K_F^{ads}:

l/n lielums:

regresijas koeficients r^2:

Testētā viela:

Testētā augsne:

Augsnes sausās masas saturs (105 ^oC, 12 h): ..... %

Temperatūra: ..... ^oC

Izmantotā analītiskā metodika: Netiešā ☐ Paralēlā ☐ Virknes ☐

Desorbcijas tests

		Simbols	Vienības	Laika intervāls	Laika intervāls	Laika intervāls	Laika intervāls
Mēģenes nr., kurai izdarīts adsorbcijas posms							
Uz augsnes adsorbētā vielas masa adsorbcijas līdzsvara stāvoklī		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Aizvadītais ūdens fāzes tilpums, kas aizstāts ar 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Kopējais tilpums ūdens fāzei kas ir saskarē ar augsni	PM	V_0	cm^3				
	VM	V_T	cm^3				
Testa vielas masa, kas ir palikusi pēc adsorbcijas līdzsvara iestāšanās nepilnīgas tilpuma aizvietošanas dēļ		m_{aq}^A	µg				
Desorbcijas kinētika							
No augsnes laikā t_i desorbētā izmērītā vielas masa		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Testa vielas mērīšanai no i-tās mēģenes ņemtais šķīduma tilpums	PM	V_f^i	cm^3				
	VM	v_a^D	cm^3				
No augsnes laika punktā t_i desorbētā vielas masa (aprēķinātā)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
No augsnes laika intervālā t_i desorbētā vielas masa (aprēķinātā)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbols	Vienības	Laika intervāls	Laika intervāls	Laika intervāls	Laika intervāls
Desorbcijas procentuālais daudzums						
Desorbcija laika punktā t_i	D_{t_i}	%				
Desorbcija laika intervālā t_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Šķietamais desorbcijas koeficients	K_{des}					

PM: paralēlā metode.

VM: virknes metode.

▼B

C.19. **ADSORBCIJAS KOEFICIENTA (K_{OC}) NOTEIKŠANA UZ AUGSNES UN UZ KANALIZĀCIJAS NOSĒDUMIEM AR AUGSTAS IZŠĶIRŠANAS ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJU (*HPLC*)**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO TG121 (2001) kopija.

1.1. IEVADS

Vielu sorbcijas izturēšanos uz augsnēm un uz kanalizācijas nosēdumiem var aprakstīt ar parametriem, ko eksperimentāli nosaka ar C.18. testa metodi. Svarīgs parametrs ir adsorbcijas koeficients, kas ir definēts kā attiecība starp vielas koncentrāciju uz augsnes/nosēdumiem un vielas koncentrāciju ūdens fāzē adsorbcijas līdzsvara stāvoklī. Adsorbcijas koeficients K_{oc}, kas ir normalizēts attiecībā pret organiskā oglekļa saturu augsnē, ir noderīgs indikators attiecībā uz ķimikālijas saistīšanās spēju uz augsnes un uz kanalizācijas nosēdumu organiskās sastāvdaļas, un tas ļauj salīdzināt dažādas ķimikālijas. Šo parametru var novērtēt, izmantojot korelācijas ar šķīdību ūdenī un ar sadalījuma koeficientu sistēmā n-oktanols/ūdens (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Šajā testā aprakstītā eksperimenta metode adsorbcijas koeficienta K_{oc} novērtēšanai uz augsnes un kanalizācijas nosēdumiem izmanto *HPLC* (8). Ar to novērtētie lielumi ir ticamāki nekā ar *QSAR* aprēķiniem iegūtie. Kā novērtēšanas metode tā nevar pilnībā aizstāt kratīšanas līdzsvara eksperimentus, kas izmantoti testa metodē C.18. Novērtētais K_{oc} tomēr var būt noderīgs piemērotu testa parametru izvēlē adsorbcijas/desorbcijas pētījumiem saskaņā ar C.18. testa metodi, aprēķinot K_d (sadalījuma koeficientu) vai K_f (Freindliha adsorbcijas koeficientu) saskaņā ar vienādojumu (3) (skatīt 1.2. punktu).

1.2. DEFINĪCIJAS

K_d: sadalījuma koeficients ir definēts kā izšķīdinātas testa vielas līdzsvara koncentrāciju attiecība divfāžu sistēmā, kas sastāv no sorbenta (augsnes vai kanalizācijas nosēdumiem) un ūdens fāzes; tas ir bezdimensiju lielums, ja koncentrācijas abās fāzēs izsaka kā masas/masas koncentrācijas. Ja ūdens fāzes koncentrācija ir dota kā masas/tilpuma koncentrācija, tad vienības ir ml. g^{-1}. K_d var mainīties, mainoties sorbenta īpašībām, un var būt atkarīgs no koncentrācijas.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

kur:

C_{soil} = testa vielas koncentrācija uz augsnes līdzsvara stāvoklī (μg· g^{-1}),

C_{sludge} = testa vielas koncentrācija uz nosēdumiem līdzsvara stāvoklī (μg· g^{-1}),

C_{aq} = testa vielas koncentrācija ūdens fāzē līdzsvara stāvoklī (μg· g^{-1}, μg· ml^{-1}).

▼B

K_f: Freindliha adsorbcijas koeficients ir definēts kā testa vielas koncentrācija uz augsnes vai uz nosēdumiem (x/m), ja līdzsvara stāvokļa koncentrācija C_{aq} ūdens fāzē ir vienāda ar vienu; vienības ir sorbenta µg. g^{-1}. Lielums var mainīties, mainoties sorbenta īpašībām.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (1)$$

kur:

x/m = testa vielas daudzums x (µg), kas adsorbēts uz sorbenta daudzuma m (g) līdzsvara stāvoklī,

1/n = Freindliha adsorbcijas izotermas slīpums,

C_{aq} = testa vielas koncentrācija ūdens fāzē līdzsvara stāvoklī (µg· ml^{-1})

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Sadalījuma koeficients (K_d) vai Freindliha adsorbcijas koeficients (K_f), normalizēts attiecībā uz sorbenta organiskā oglekļa saturu (f_{oc}); jo īpaši nejonizētām ķimikālijām tas ir aptuvens indikators vielas adsorbcijas līmenim uz sorbenta un ļauj salīdzināt dažādas ķimikālijas. Atkarībā no K_d un K_f dimensijām K_{oc} var būt bezdimensiju lielums vai arī tam var būt vienības ml. g^{-1} vai µg. g^{-1} organisko vielu.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimensionless or ml} \cdot g^{-1}\right) \text{or} \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Sakarība starp K_{oc} un K_d vienmēr nav lineāra, un K_{oc} lielumi var mainīties no augsnes uz augsni, bet to mainīgums ir stipri mazāks, salīdzinot ar K_d vai K_f lielumiem.

Adsorbcijas koeficientu (K_{oc}) iegūst no ietilpības koeficienta (k'), izmantojot ar izraudzītiem standartsavienojumiem konstruētu kalibrācijas grafiku log k' pret log K_{oc}.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kur:

t_R = testa vielas un standartvielas *HPLC* aiztures laiks (minūtēs),

t_0 = *HPLC* "mirušais" laiks (minūtēs) (skatīt 1.8.2. punktu).

P_{OW}: sadalījuma koeficients sistēmā oktanols–ūdens ir definēts kā izšķīdušās vielas koncentrāciju attiecība n-oktanolā un ūdenī; tas ir bezdimensiju lielums.

$$Pow = \frac{C_{octanol}}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3. STANDARTVIELAS

Pirms metodes izmantošanas jāzina struktūrformula, tīrība un – attiecīgā gadījumā – disociācijas konstante. Noderīga ir informācija par šķīdību ūdenī un organiskajos šķīdinātājos, par sadalījuma koeficientu sistēmā oktanols–ūdens un par hidrolīzes īpašībām.

▼B

Lai korelētu testa vielas izmērītos *HPLC* aiztures laika datus ar adsorbcijas koeficientu K_{oc}, ir jāizveido kalibrācijas grafika log K_{oc} atkarībai no log k'. Jāizmanto vismaz seši kalibrācijas punkti, vismaz viens zem testa vielas sagaidāmā lieluma un vismaz viens virs šā lieluma. Metodes precizitāte ievērojami uzlabosies, ja izmantos standartvielas, kas ir strukturāli radniecīgas testa vielai. Ja tādi dati nav pieejami, tad piemērotas kalibrēšanas vielas izvēlas pēc lietotāja ieskatiem. Tādā gadījumā būtu jāizvēlas vispārīgāks strukturāli dažādu vielu kopums. Vielas un K_{oc} lielumi, ko var izmantot, ir uzskaitīti papildinājuma 1. tabulā kanalizācijas nosēdumiem un 3. tabulā augsnei. Citu kalibrācijas vielu izvēle ir jāpamato.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

HPLC izdara ar analīzes kolonnām, kas pildītas ar tirdzniecībā pieejamu ciānpropila cieto fāzi, kura satur lipofīlas un polāras daļiņas. Izmanto vidēji polāru nekustīgo fāzi uz silikagēla matrices:

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silikagēls	nepolāra atdalošā daļa	polārā daļiņa

Testa metodes princips ir līdzīgs A.8. testa metodei (sadalījuma koeficients, *HPLC* metode). Ejot cauri kolonnai kopā ar kustīgo fāzi, testa viela savstarpēji iedarbojas ar nekustīgo fāzi. Sadalīšanās dēļ starp kustīgo un nekustīgo fāzi testa viela aizkavējas. Nekustīgās fāzes struktūras divdabība ar polārām un nepolārām vietām ļauj tai savstarpēji sadarboties ar molekulas polārajām un nepolārajām grupām līdzīgi tam, kā notiek ar augsnes vai kanalizācijas nosēdumu matrices organiskajām sastāvdaļām. Tas dod iespēju noskaidrot sakarību starp aiztures laiku kolonnā un adsorbcijas koeficientu uz organiskās sastāvdaļas.

Sorbcijas izturēšanos lielā mērā ietekmē pH, jo īpaši polārām vielām. Lauksaimniecības augsnēs vai kanalizācijas ūdeņu attīrīšanas uzņēmumu tvertnēs pH parasti mainās no 5,5 līdz 7,5. Jonizējamām vielām būtu jāizdara divi testi gan ar jonizēto, gan ar nejonizēto formu piemērotos buferšķīdumos, bet tikai tad, ja vismaz 10 % testa vielas disociē pH intervālā no 5,5 līdz 7,5.

Tā kā novērtēšanai izmanto vienīgi sakarību starp aizturi *HPLC* kolonnā un adsorbcijas koeficientu, nav vajadzīga kvantitatīva analītiska metode un ir jānosaka tikai aiztures laiks. Ja ir pieejams piemērotu standartvielu kopums un var izmantot standarta eksperimentālos apstākļus, metode nodrošina ātru un efektīvu veidu adsorbcijas koeficienta K_{oc} noteikšanai.

1.5. TESTA PIELIETOJAMĪBA

HPLC metode ir izmantojama ķīmiskām vielām (iezīmētām vai neiezīmētām), kurām ir pieejama piemērota noteikšanas sistēma (piemēram, spektrofotometrs, radioaktivitātes detektors) un kuras ir pietiekami stabilas eksperimenta laikā. Metode var būt jo īpaši noderīga ķimikālijām, ko ir grūti pētīt citās eksperimenta sistēmās (t. i., gaistošām vielām; vielām, kas nešķīst ūdenī koncentrācijās, kuras var analītiski mērīt; vielām, kurām ir liela tieksme attiecībā uz inkubācijas sistēmas virsmu). Metodi var izmantot maisījumiem, kas dod neizšķirtas eluēšanas joslas. Tādā gadījumā testa maisījuma savienojumiem ir jānosaka log K_{oc} lielumu augšējā un apakšējā robeža.

▼B

Dažreiz *HPLC* rezultātu interpretācijā sarežģījumus var radīt piemaisījumi, bet tie ir mazsvarīgi, ja testa vielu var skaidri identificēt un atdalīt no piemaisījumiem.

Metodes pareizība ir pārbaudīta papildinājuma 1. tabulā uzskaitītajām vielām, un metode ir lietota arī dažādām citām ķimikālijām, kas pieder šādām ķīmisko savienojumu klasēm:

— aromātiskajiem amīniem (piemēram, trifluralīns, 4-hloranilīns, 3,5-dinitroanilīns, 4-metilanilīns, N-metilanilīns, 1-naftilamīns),

— aromātiskajiem karbonskābju esteriem (piemēram, benzoskābes metilesteris, 3,5-dinitrobenzoskābes etilesteris),

— aromātiskajiem ogļūdeņražiem (piemēram, toluols, ksilols, etilbenzols, nitrobenzols),

— ariloksifenoksipropionskābes esteriem (piemēram, diklofop-metils, fenoksaprop-etils, fenoksaprop-P-etils),

— benzimidazola un imidazola fungicīdiem (piemēram, karbendazims, fuberidazols, triazoksīds),

— karbonskābju amīdiem (piemēram, 2-hlorbenzamīds, N, N-dimetilbenzamīds, 3,5-dinitrobenzamīds, N-metilbenzamīds, 2-nitrobenzamīds, 3-nitrobenzamīds),

— hlorētajiem ogļūdeņražiem (piemēram, endosulfāns, DDT, heksahlorbenzols, kvintocēns, 1,2,3-trihlorbenzols),

— fosfororganiskajiem insekticīdiem (piemēram, azinfos-metils, disulfotons, fenamifoss, izofenfoss, pirazofoss, sulprofoss, triazofoss),

— fenoliem (piemēram, fenols, 2-nitrofenols, 4-nitrofenols, pentahlorfenols, 2,4,6-trihlorfenols, 1-naftols),

— fenilurīnvielas atvasinājumiem (piemēram, izoproturons, monolinurons, pensikurons),

— pigmenta krāsvielām (piemēram, *Acid Yellow* 219, *Basic Blue* 41, *Direct Red* 81),

— poliaromātiskajiem ogļūdeņražiem (piemēram, acenaftēns, naftalīns),

— 1,3,5-triazīna herbicīdiem (piemēram, prometrīns, propazīns, simazīns, terbutrīns),

— triazola atvasinājumiem (piemēram, tebukonazols, triadimefons, tradimenols, triapentenols).

Metode nav izmantojama vielām, kas reaģē ar eluentu vai ar nekustīgo fāzi. Tā nav izmantojama arī vielām, kas īpašā veidā iedarbojas ar neorganiskajām sastāvdaļām (piemēram, veido klasteru kompleksus ar mālu minerālvielām). Metode var nebūt derīga virsmas aktīvām vielām, neorganiskiem savienojumiem un vidēji stiprām vai stiprām organiskām skābēm un bāzēm. Var noteikt log K_{oc} lielumus no 1,5 līdz 5,0. Jonizējamas vielas ir jāmēra, izmantojot buferētu kustīgo fāzi, bet ir jāpievērš uzmanība, lai neizgulsnētos bufera sastāvdaļas vai testa viela.

▼B

1.6. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.6.1 **Precizitāte**

Parasti testa vielas adsorbcijas koeficientu var noteikt ar precizitāti ± 0,5 logaritmiskās vienības no lieluma, kas noteikts ar kratīšanas metodi (skatīt papildinājuma 1. tabulu). Lielāku precizitāti var sasniegt, ja izmantotās standartvielas ir strukturāli radniecīgas testa vielai.

1.6.2. **Atkārtojamība**

Noteikšanas jāizdara vismaz divos eksemplāros. No atsevišķajiem mērījumiem iegūtajiem log K_{oc} lielumiem jābūt 0,25 logaritmisko vienību diapazonā.

1.6.3 **Reproducējamība**

Pagaidām izmantošanā gūtā pieredze apstiprina metodes derīgumu. *HPLC* metodes pētījumā, izmantojot 48 vielas (galvenokārt pesticīdus), par kurām bija pieejami ticami K_{oc} dati uz augsnēm, ir iegūts korelācijas koeficients R = 0,95 (10) (11).

Lai uzlabotu un pamatotu šo metodi, tika izdarīts starplaboratoriju salīdzinošs tests, kurā piedalījās 11 laboratorijas (12). Rezultāti ir papildinājuma 2. tabulā.

1.7. TESTA METODES APRAKSTS

1.7.1. **Adsorbcijas koeficienta novērtēšanas priekšmēģinājums**

Par indikatoriem adsorbcijas lielumam var izmantot sadalījuma koeficientu sistēmā oktanols–ūdens P_{ow} (= K_{ow}) un, zināmā mērā, šķīdību ūdenī, jo īpaši nejonizētām vielām, un tādā veidā tos var izmantot, lai iepriekš novērtētu diapazonu. Vairākām ķimikāliju grupām ir publicētas dažādas noderīgas korelācijas (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Iekārta**

Šķidruma hromatogrāfs, aprīkots ar bezpulsāciju sūkni un piemērotu detektoru. Ir ieteicams izmantot injicēšanas ventili ar injekciju cilpu. Izmanto tirdzniecībā esošos ķīmiski piesaistītos ciānpropila sveķus uz silikagēla pamata (piemēram, *Hypersil* un *Zorbax CN*). Starp injekcijas sistēmu un analīzes kolonnu var ievietot tā paša materiāla priekškolonnu. Dažādu piegādātāju kolonnas var ievērojami atšķirties pēc sadalīšanas efektivitātes. Orientējoši vajadzētu sasniegt šādus ietilpības koeficientus k': log k' > 0,0, ja log K_{oc} = 3,0 un log k' > 0,4, ja log K'_{oc} = 2,0, izmantojot 55/45 % metanola/ūdens maisījumu par kustīgo fāzi.

1.7.3. **Kustīgās fāzes**

Ir testētas vairākas kustīgās fāzes, un ir ieteicamas šādas divas:

— metanols/ūdens (55/45 % tilp./tilp.),

— metanols/0,01M citrāta buferšķīdums pH 6,0 (55/45 % tilp./tilp.).

▼B

Lai pagatavotu eluentu, izmanto *HPLC* kvalitātes metanolu un destilētu ūdeni vai citrāta buferšķīdumu. Maisījumu pirms lietošanas atbrīvo no gāzēm. Jāizmanto izokrātiskā eluēšana. Ja metanola/ūdens maisījumi nav piemēroti, var izmēģināt citus organisko šķīdinātāju/ūdens maisījumus, piemēram, etanola/ūdens vai acetonitrila/ūdens maisījumus. Jonizējamiem savienojumiem ir ieteicams lietot buferšķīdumu, lai stabilizētu pH. Ir jāpievērš vērība, lai neizgulsnētu sāļus un nebojātu kolonnu, kas var notikt ar dažiem organiskās fāzes/buferšķīdumu maisījumiem.

Nedrīkst izmantot tādas piedevas kā jonu pāru reaģenti, jo tie var ietekmēt nekustīgās fāzes sorbcijas īpašības. Tādas nekustīgās fāzes pārmaiņas var būt neatgriezeniskas. Šā iemesla dēļ eksperimentus, kuros izmanto piedevas, izdara ar atsevišķām kolonnām.

1.7.4. **Šķīdināmās vielas**

Testa vielas un standartvielas jāizšķīdina kustīgajā fāzē.

1.8. TESTA VEIKŠANA

1.8.1. **Testa apstākļi**

Mērījumu laikā jāreģistrē temperatūra. Lai garantētu nemainīgus apstākļus kalibrēšanas gaitā un testa vielas vērtēšanas un mērīšanas gaitā, ir ļoti ieteicams izmantot kolonnas termostatu ar kontrolējamu temperatūru.

1.8.2. **“Mirušā” laika t_o noteikšana**

“Mirušā” laika t_o noteikšanai var izmantot divas atšķirīgas metodes (skatīt arī 1.2. punktu).

1.8.2.1. *“Mirušā” laika t_o noteikšana ar homologu rindām*

Ir pārbaudīts, ka šī procedūra dod ticamus un standartizētus to lielumus. Sīkāku informāciju skatīt A.8. testa metodē: Sadalījuma koeficients (n-oktanols/ūdens), *HPLC* metode.

1.8.2.2. *“Mirušā” laika t_o noteikšana ar inertām vielām, ko neaiztur kolonna*

Šī metode pamatojas uz formamīda, urīnvielas vai nātrija nitrāta šķīdumu injicēšanu. Noteikšanas jāizdara vismaz divos eksemplāros.

1.8.3. **Aiztures laiku tR noteikšana**

Standartvielas jāizraugās, kā aprakstīts 1.3. punktā. Lai noteiktu standartvielu aiztures laikus, tās var injicēt kā jauktu standartu ar nosacījumu, ka ir apstiprināts, ka katras standartvielas aiztures laiku neietekmē citu standartvielu klātbūtne. Kalibrēšana būtu jāizdara regulāri vismaz divreiz dienā, lai ņemtu vērā neparedzētas pārmaiņas kolonnas darbībā. Labākai praksei kalibrēšanas injekcijas būtu jāizdara pirms testa vielas injicēšanas un pēc tās, lai apstiprinātu, ka aiztures laiki nav nobīdījušies. Testa vielas injicē atsevišķi iespējami mazos daudzumos (lai novērstu kolonnas pārslodzi) un nosaka to aiztures laikus.

▼B

Lai palielinātu mērījumu ticamību, noteikšanas ir jāizdara vismaz divos eksemplāros. No atsevišķajiem mērījumiem iegūtajiem log K_{oc} lielumiem jābūt 0,25 logaritmisko vienību diapazonā.

1.8.4. **Novērtēšana**

Izraudzītajām standartvielām no "mirušā" laika to un no aiztures laikiem tR aprēķina ietilpības koeficientus k' saskaņā ar vienādojumu (4) (skatīt 1.2. punktu). Standartvielu log k' pēc tam atliek grafiski pret standartvielu log K_{oc} lielumiem, kas iegūti kratīšanas eksperimentos un doti papildinājuma 1. un 3. tabulā. Izmantojot minēto grafiku, no testa vielas log k' lieluma pēc tam nosaka tās log K_{oc} lielumu. Ja faktiskais rezultāts rāda, ka testa vielas log K_{oc} ir ārpus kalibrēšanas diapazona, tests ir jāatkārto, izmantojot citas, piemērotākas standartvielas.

2. **DATI UN TO NOFORMĒŠANA**

Ziņojumā jāiekļauj šāda informācija:

— testa vielu un standartvielu identifikācija un to tīrība, un attiecīgā gadījumā pKa lielumi,

— iekārtas un darba apstākļu apraksts, piemēram, analītiskās kolonnas (un priekškolonnas) tips un izmēri, detektors, kustīgā fāze (komponentu attiecība un pH), temperatūras diapazons mērījumu laikā,

— "mirušais" laiks un tā noteikšanas metode,

— kolonnā ievadītie testa vielas un standartvielu daudzumi,

— kalibrēšanā izmantoto standartvielu aiztures laiki,

— uzkonstruētās regresijas līnijas dati (log k' pret log Koc) un regresijas līnijas grafiks,

— testa savienojuma vidējie aiztures laika dati un noteiktais log Koc lielums,

— hromatogrammas.

3. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 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, p. 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, p.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, p. 227–231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 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, p. 831–832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 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), p. 121–128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 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), p. 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, p. 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), p. 1373–1384.

▼B

PAPILDINĀJUMS

1. tabula

K_{oc} lielumu salīdzinājums augsnēm un kanalizācijas nosēdumiem ar lielumiem, kas aprēķināti no *HPLC* skrīninga metodes ([1]) ([2])

Viela	*CAS* Nr.	log K_{oc} kanalizācijas nosēdumiem	log K_{oc} *HPLC*	Δ	log K_{oc} augsnēm	log K_{oc} *HPLC*	Δ
Atrazīns	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linurons	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentions	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monurons	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrēns	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoskābes fenilesteris	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamīds	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamīds	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilīds	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilīns	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dihloranilīns	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), p. 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), p. 107–119.

2. tabula

Starplaboratoriju salīdzinoša testa (piedalījušās 11 laboratorijas) rezultāti *HPLC* metodes uzlabošanai un novērtēšanai ([1])

Substance	*CAS* Nr.	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[*HPLC* metode]	
Atrazīns	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monurons	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenols	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linurons	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentions	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), p. 1373–1384.

▼B

3. tabula

Ieteicamās standartvielas *HPLC* skrīninga metodei, kas pamatojas uz datiem par adsorbciju uz augsnes.

Standartviela	*CAS* Nr.	Vidējie K_{oc} lielumi no kratīšanas metodes	K_{oc} datu skaits	log S.D.	Avots
Acetanilīds	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenols	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamīds	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N.N-dimetilbenzamīds	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metilbenzamīds	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metilbenzoāts	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazīns	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Izoproturons	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamīds	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilīns	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamīds	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazīms	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenols	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoksīds	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazofoss	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linurons	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalīns	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfāndiols	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarbs	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trihlorbenzols	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fentions	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pirazofoss	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfans	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metils	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantrēns	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (mix)	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 01 044 (1994).
([b]) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, p. 285–304.
([c]) Rūpniecības dati.

▼M7

C.20. **DAPHNIA MAGNA** VAIROŠANĀS TESTS

IEVADS

Šī testēšanas metode (TM) ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 211 (2012). ESAO testēšanas vadlīnijas tiek periodiski pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību. Vairošanās teta testēšanas vadlīnija Nr. 211 ir no Testēšanas vadlīnijas Nr. 202 II daļas "*Daphnia* sp. reproduction test" (1984). Ir vispāratzīts, ka dati no testiem, kas veikti saskaņā ar *TG* 202, var būt mainīgi. Rezultātā lielas pūles tika veltītas tam, lai identificētu šā mainīguma iemeslus ar mērķi izstrādāt labāku testēšanas metodi. Testēšanas vadlīnija Nr. 211 balstās uz šo pētniecisko darbību un 1992. gadā (1), 1994. gadā (2) un 2008. gadā (3) veiktu starplaboratoriju salīdzināšanas un validācijas pētījumu rezultātiem.

Galvenās atšķirības starp vairošanās testa testēšanas vadlīnijas sākotnējo versiju (*TG* 202, 1984) un otro versiju (*TG* 211, 1998) ir šādas:

— ieteicamā izmantojamā suga ir *Daphnia magna*;

— testa ilgums ir 21 diena;

— pusstatiskos testos katrā testējamajā koncentrācijā izmantojamo dzīvnieku skaits ir samazināts no vismaz 40 dzīvniekiem, kuri, vēlams, sadalīti četrās grupās pa 10 dzīvniekiem katrā grupā, līdz vismaz 10 dzīvniekiem, kas tiek turēti atsevišķi (kaut arī caurplūdes testos var izmantot dažādus plānus);

— ir izveidoti konkrētāki ieteikumi attiecībā uz testa barotni un barošanas apstākļiem.

— Galvenās atšķirības starp vairošanās testa testēšanas vadlīnijas otro versiju (*TG* 211, 1998) un šo versiju ir šādas:

— ir pievienots 7. papildinājums, lai vajadzības gadījumam izskaidrotu jaundzimušo dzimuma identificēšanas procedūru. Iepriekšējām šīs testēšanas metodes versijām dzimumu attiecība ir fakultatīvs beigupunkts;

— testa kritērijs attiecībā uz radīto dzīvo pēcnācēju skaitu uz vienu dzīvu vecāku ir papildināts ar papildu testa kritēriju attiecībā uz *Daphnia* vairošanos, t. i., testa beigās radīto dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu *Daphnia* vecāku testa sākumā, no analīzes izslēdzot vecāku nejaušu un/vai netīšu mirstību. Pievienotā testa kritērija mērķis ir šo testa kritēriju pielīdzināt citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm. Turklāt attiecībā uz šo testa kritēriju šajā testēšanas metodē ir iespējams likvidēt kļūdas avotu, proti, ietekmi, ko rada vecāku nejauša un/vai netīša mirstība, ja tā radusies ekspozīcijas perioda laikā;

— gan *ECx* (piemēram, EC10 vai EC50), gan *NOEC/LOEC* pieejā ir iekļauti papildu statistiskie norādījumi attiecībā uz testa plānu un rezultātu apstrādi;

— ir ieviests robežtests.

Izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

Testa galvenais mērķis ir novērtēt ķimikāliju ietekmi uz *Daphnia magna* vairošanās iznākumu. Šajā sakarībā jaunas *Daphnia* mātītes (vecākus), kas testa sākumā ir jaunākas par 24 stundām, eksponē testējamai ķimikālijai, kas pievienota ūdenim koncentrāciju diapazonā. Testa ilgums ir 21 diena. Testa beigās novērtē radīto dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu. Vecāku vairošanās iznākumu var izteikt citādi (piemēram, kā dzīvo pēcnācēju skaitu, kas radušies uz vienu dzīvnieku dienā, sākot no pirmās dienas, kad ir novērots, ka radies pēcnācējs), bet tie būtu pārskatā jāatspoguļo papildus testa beigās radušos dzīvo pēcteču kopskaitam. Tā kā pusstatiskajam testam, salīdzinot ar citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm, ir īpaša struktūra, ir arī iespējams noteikt dzīvo pēcnācēju skaitu, ko radījis katrs no vecākiem atsevišķi. Atšķirībā no citām bezmugurkaulnieku vairošanās testēšanas metodēm šī metode dod iespēju no datu novērtējuma izslēgt radītos pēcnācējus, ja to vecāki testa laikā nejauši un/vai netīši nomirst. Tādējādi, ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku

▼M7

mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, piemēram, ja novērojama būtiska atbildreakcijas regresija attiecībā pret testējamās ķimikālijas koncentrāciju ar pozitīvu līknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna-Armitāža trenda testu). Ja mirstība devas–atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, no testa rezultātiem jāizslēdz. Ja mirstība atbilst devas–atbildereakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda pārskatā kā testējamās ķimikālijas ietekme un replikāti no analīzes nav jāizslēdz. Ja vecāks mirst testēšanas laikā, t. i., nejauši nepareizas apiešanās vai negadījuma dēļ vai netīši ar testējamās ķimikālijas ietekmi nesaistīta neizskaidrojama notikuma dēļ, vai, izrādās par vīrišķā dzimuma dzīvnieku, replikātu no analīzes izslēdz (vairāk sk. 51. punktā). Testējamās ķimikālijas toksisko iedarbību uz vairošanos apzīmē ar *ECx*, ar nelineārās regresijas palīdzību datus pielāgojot attiecīgam modelim, lai noteiktu koncentrāciju, kas attiecīgi varētu izraisīt x % reproduktīvā iznākuma samazinājumu, vai alternatīvi to apzīmē kā *NOEC/LOEC* vērtību (4). *Vēlams, lai testējamās koncentrācijas ietver zemāko izmantoto ietekmes koncentrāciju (piemēram, EC_{10}), kas nozīmē, ka šo vērtību aprēķina ar interpolāciju, nevis ekstrapolāciju.*

Ir jānorāda arī izdzīvojušie vecāki un pirmo pēcnācēju rašanās laiks. Var izmeklēt arī ķimikālijas radītu citu veidu ietekmi uz tādiem parametriem kā augšana (piemēram, garums) un iespējamais populācijas pieauguma patiesais ātrums (sk. 44. punktu).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

Rezultāti no akūtā toksiskuma testa (sk. šā pielikuma C.2. nodaļu *Daphnia sp*. akūtais imobilizācijas tests), ko veic ar *Daphnia magna*, var būt lietderīgi, vairošanās testos izraugoties piemērotu testējamo koncentrāciju diapazonu. Jāzina testējamās ķimikālijas šķīdība ūdenī un tvaika spiediens, un jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei ķimikālijas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ar zināmu atgūstamības koeficientu un noteikšanas robežu.

Informācija par testējamo ķimikāliju, kas var būt lietderīga, nosakot testēšanas apstākļus, ietver struktūrformulu, ķimikālijas tīrību, stabilitāti gaismā, stabilitāti testa apstākļos, pKa, P_{ow} un testa rezultātus attiecībā uz tūlītējo bionoārdāmību (sk. šā pielikuma C.4. nodaļu (tūlītējas bionoārdāmības noteikšana) un C.29. nodaļu (tūlītēja bionoārdāmība – CO_2 hermētiski noslēgtos traukos)).

TESTA DERĪGUMS

Lai tests būtu derīgs, kontroles mēģinājumā(-os) tam jāatbilst šādiem izpildes kritērijiem:

— vecāku (*Daphnia* mātīšu) mirstība testa beigās nepārsniedz 20 %;

— testa beigās dzīvu uz vienu vecāku radušos dzīvo pēcnācēju vidējais skaits ir ≥ 60.Piezīme: tādu pašu derīguma kritēriju (20 %) var izmantot, lai kontrolētu vecāku nejaušu un netīšu mirstību, kā arī katrai no testējamām koncentrācijām.

▼M7

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

Testa traukiem un citam aprīkojumam, kas nonāk saskarē ar testa šķīdumiem, jābūt veidotiem pilnībā no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Testa trauki parasti ir stikla vārglāzes.

Turklāt nepieciešama kāda no šīm iekārtām vai tās visas:

— oksimetrs (ar mikroelektrodu vai citu ierīci, kas piemērota izšķīdušā skābekļa mērīšanai maza tilpuma paraugos);

— piemērots temperatūras kontroles aprīkojums;

— pH metrs;

— iekārta ūdens cietības noteikšanai;

— iekārta ūdens kopējā organiskā oglekļa koncentrācijas (*TOC*) noteikšanai vai iekārta skābekļa ķīmiskā patēriņa (*COD*) noteikšanai;

— piemērota iekārta apgaismojuma režīma kontrolei un gaismas intensitātes mērīšanai.

Testa organisms

Testā izmantojamā suga ir *Daphnia magna Straus* ([1]).

Vēlams klonu identificēt, nosakot genotipu. Pētījumā (1) ir parādīts, ka klons A (kura izcelsme ir *IRCHA* Francijā) (5) konsekventi atbilst derīguma kritērijam par vidēji 60 dzīviem pēcnācējiem, rēķinot uz vienu vecāku, ja tos audzē šajā testēšanas metodē aprakstītajos apstākļos. Tomēr ir pieņemami citi kloni, ja ir parādīts, ka *Daphnia* audzēšana atbilst testa derīguma kritērijiem.

Testu uzsākot, dzīvniekiem jābūt mazāk nekā 24 stundas veciem, un tie nedrīkst būt tiešie pēcnācēji no pirmā nārsta. To izcelsmei jābūt no veselīga bara (t. i., tiem nav novērojamas tādas stresa pazīmes kā liela mirstība, tēviņu un efipiju klātbūtne, pirmā nārsta aizkavēšanās, krāsu zaudējuši dzīvnieki utt.). Bara dzīvnieki jātur tādos audzēšanas apstākļos (gaisma, temperatūra, vide, barošana un dzīvnieku skaits tilpuma vienībā), kas ir līdzīgi testā izmantojamiem apstākļiem. Ja testā izmantotā *Daphnia* barotne atšķiras no vides, ko izmanto parastā *Daphnia* audzēšanā, laba prakse ir iekļaut pirmstesta aklimatizācijas posmu, kas parasti ilgst aptuveni trīs nedēļas (t. i., viena paaudze), lai izvairītos no vecāku stresa.

Testa barotne

Šajā testā ieteicams izmantot pilnībā definētu barotni. Tā var izvairīties no grūti raksturojamu piedevu (piemēram, jūraszāļu, augsnes ekstrakta utt.) izmantošanas un līdz ar to uzlabot standartizācijas iespējas starp laboratorijām. Šim mērķim par piemērotām tiek uzskatītas *Elendt* M44 (6) un M7 barotnes (sk. 2. papildinājumu). Tomēr ir pieņemamas citas barotnes (piemēram, (7) (8)) ar nosacījumu, ka ir pierādīts, ka *Daphnia* audzēšana atbilst testa derīguma kritērijiem.

([1]) Var izmantot citas *Daphnia* sugas, ja tās atbilst attiecīgiem derīguma kritērijiem (derīguma kritērijam, kas attiecas uz vairošanās iznākumu kontroles testā, jābūt raksturīgam *visām* sugām). Ja izmanto citas *Daphnia* sugas, tās ir skaidri jānorāda un to izmantojums jāpamato.

▼M7

Ja izmanto barotni, kurā ietilpst nedefinētas piedevas, šādas piedevas skaidri jānorāda un testēšanas pārskatā jāsniedz informācija par sastāvu, jo īpaši attiecībā uz oglekļa saturu, jo tas var dot ieguldījumu paredzētajā barībā. Ir ieteicams noteikt kopējo organisko oglekli (*TOC*) un/vai skābekļa ķīmisko patēriņu (*COD*) organiskās piedevas izejas preparātā un novērtēt ieguldījumu attiecībā uz *TOC/COD* pagatavotajā testa barotnē. Vēl ir ieteicams, lai barotnes *TOC* līmeņi (t. i., pirms aļģu pievienošanas) būtu mazāki par 2 mg/l (9).

Ja testējamās ķimikālijas satur metālus, ir svarīgi apzināties, ka testa barotnes īpašības (piemēram, cietība, helātu veidošanas spēja) var ietekmēt testējamās ķimikālijas toksiskumu. Šā iemesla dēļ ir vēlama pilnībā definēta barotne. Tomēr pašlaik vienīgās pilnībā definētās barotnes, par kurām ir zināms, ka tās ir piemērotas *Daphnia magna* ilgtermiņa audzēšanai, ir *Elendt* M4 un M7. Abas barotnes satur helātus veidojošo reaģentu *EDTA*. Pētījumā (2) ir parādīts, ka kadmija "šķietamais toksiskums" parasti ir mazāks, ja vairošanās testu veic M4 un M7 barotnē, nekā ja to veic barotnē, kas nesatur *EDTA*. Tādēļ M4 un M7 nav ieteicamas, lai testētu metālus saturošas ķimikālijas, un jāizvairās arī lietot citas barotnes, kas satur zināmus helātus veidojošus reaģentus. Metālus saturošām ķimikālijām var būt ieteicams izmantot alternatīvu barotni, piemēram, *ASTM* rekonstituētu cietu, svaigu ūdeni (9), kas nesatur *EDTA*. *ASTM* rekonstituēta cieta, svaiga ūdens un jūraszāļu ekstrakta apvienošana (10) ir piemērota *Daphnia magna* audzēšanai ilgtermiņā (2).

Izšķīdušā skābekļa koncentrācijai testa sākumā un tā laikā jābūt virs 3 mg/l. pH jābūt 6–9 diapazonā, un parasti tas vienā testā nedrīkst mainīties par vairāk nekā 1,5 vienībām. Cietība ir ieteicama lielāka par 140 mg/l (rēķinot uz $CaCO_3$). Testi šajā līmenī un virs tā ir parādījuši vairošanās spēju, kas atbilst derīguma kritērijiem (11) (12).

Testa šķīdumi

Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumus vēlams sagatavot, neizmantojot nekādus šķīdinātājus vai izkliedētājus, ja tas iespējams, testējamo ķimikāliju testa barotnē iemaisot vai iejaucot testa barotnē ar mehāniskiem līdzekļiem, piemēram, jaukšanu, kratīšanu vai apstrādi ar ultraskaņu, vai izmantojot citas piemērotas metodes. Ja ir prasīts pirms testa organismu iesaistīšanas pierādīt, ka tiek saglabātas stabilas ekspozīcijas koncentrācijas, testa sistēmas vēlams eksponēt tādām testējamās ķimikālijas koncentrācijām, kas tiks izmantotas pētījumā. Ja testējamo ķimikāliju ir grūti izšķīdināt ūdenī, jāizmanto ESAO Norādījumos par sarežģītu vielu apstrādi (13) aprakstītās procedūras. Jāvairās no šķīdinātāju vai izkliedētāju izmantošanas, tomēr atsevišķos gadījumos, lai pagatavotu dozēšanai vajadzīgās koncentrācijas izejšķīdumu, tie var būt nepieciešami.

Papildus testējamām koncentrācijām jāveic arī atšķaidīšanas ūdens kontrole ar pienācīgiem replikātiem un, ja nav iespējams citādi, arī šķīdinātāja kontrole ar pienācīgiem replikātiem. Testā jāizmanto tikai tādi šķīdinātāji vai izkliedētāji, par kuriem ir noskaidrots, ka tiem nav nekādas būtiskas vai ir tikai neliela ietekme uz testa kritērijiem. Piemērotu šķīdinātāju (piemēram, acetona, etanola, metanola,

▼M7

dimetilformamīda un trietilēnglikola) un izkliedētāju (piemēram, *Cremophor* RH40, metilcelulozes 0,01 % un HCO-40) paraugi ir norādīti (13). Ja izmanto šķīdinātāju vai izkliedētāju, tā gala koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0,1 ml/l (13) un tā koncentrācijai jābūt vienādai visos testa traukos, izņemot atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Tomēr jāpieliek visas pūles, lai šķīdinātāja koncentrāciju saglabātu minimālajā līmenī.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Ilgums

Testa ilgums ir 21 diena.

Ievietošana

Vecākus tur atsevišķi, pa vienam katrā testa traukā, parasti katrā traukā 50–100 ml barotnes (attiecībā uz *Daphnia magna* var izmantot mazāku tilpumu, jo īpaši mazākiem *Daphnia* sugu dzīvniekiem, piemēram, *Ceriodaphnia dubia*), ja vien testēšanā nav nepieciešama caurplūdes testa struktūra.

Lai izpildītu analītiskās procedūrs prasības, ko izmanto testējamās ķimikālijas koncentrācijas noteikšanai, dažreiz var būt vajadzīgi lielāki tilpumi, kaut arī ir pieļaujams ķīmiskās analīzes nolūkam apvienot vienādas koncentrācijas trauku saturu. Ja izmanto tilpumus, kas lielāki par 100 ml, var būt nepieciešams palielināt *Daphnia* doto barības daudzumu, lai nodrošinātu pienācīgu barības pieejamību un atbilstību derīguma kritērijiem.

Testa dzīvnieki

Pusstatiskos testos vismaz 10 dzīvniekus tur atsevišķi katrā testējamā koncentrācijā un vismaz 10 dzīvniekus tur atsevišķi kontroles sērijā.

Caurplūdes testos ir parādīts, ka ir piemēroti 40 dzīvniekus sadalīt četrās grupās pa 10 dzīvniekiem katrā testējamā koncentrācijā (1). Var izmantot mazāku testa organismu skaitu un ir ieteicams vismaz 20 dzīvnieki uz koncentrāciju, sadalot divos vai vairākos replikātos ar vienādu dzīvnieku skaitu (piemēram, četri replikāti ar piecām dafnijām katrā). Jāņem vērā, ka testos, kuros dzīvniekus tur grupās, no statistiskās analīzes nebūs iespējams izslēgt kādu no pēcnācējiem, ja rodas nejauša/netīša vecāku mirstība, kad ir sākusies vairošanās, un līdz ar to šajos gadījumos vairošanās iznākums būtu jāizsaka kā dzīvo pēcnācēju kopējais skaits, kas radušies no viena vecāka testa sākumā.

Apstrāde jāveic testa traukos, un visas turpmākās darbības ar testa traukiem jāveic randomizēti. Ja tā nedara, tas var radīt neobjektivitāti, ko varētu uzskatīt par ietekmi uz koncentrāciju. Jo īpaši, ja ar eksperimenta vienībām rīkojas apstrādes vai koncentrācijas secībā, dažas ar laiku saistītas ietekmes, piemēram, eksperimenta veicēja nogurums vai cita kļūda, lielāku ietekmi var radīt lielākās koncentrācijās. Turklāt, ja testa rezultātus varētu ietekmēt testa sākotnējie vai apkārtējie apstākļi, piemēram, novietojums laboratorijā, tad būtu jāapsver, vai testu nebloķēt.

Barošana

Pusstatiskos testos barošanu vēlams veikt reizi dienā, bet vismaz trīs reizes nedēļā (t. i. atbilstīgi vides pārmaiņām). Jāņem vērā ekspozīcijas koncentrāciju iespējamais atšķaidījums, pievienojot barību, un no tās iespējami jāizvairās ar stipras koncentrācijas aļģu suspensijām. Novirzes no tā (piemēram, caurplūdes testos) jānorāda pārskatā.

Testa laikā vecāku uzturam vēlams izmantot dzīvas vienas vai vairāku šādu sugu aļģu šūnas: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (agrāk *Selenastrum capricornutum*) un *Desmodesmus subspicatus* (agrāk *Scenedesmus subspicatus*). Piegādātajam uzturam jāpamatojas uz katram vecākam nodrošinātā organiskā oglekļa (C) daudzumu. Pētījumā (14) ir parādīts, ka *Daphnia magna* gadījumā

▼M7

ar barības līmeņiem no 0,1 līdz 0,2 mg C uz *Daphnia* dienā pietiek, lai sasniegtu vajadzīgo dzīvo pēcnācēju skaitu atbilstīgi testa derīguma kritērijiem. Barību var piegādāt vai nu nemainīgā daudzumā visā testa laikā, vai, ja vēlas, sākumā var piegādāt mazāku daudzumu un pēc tam testa laikā to palielināt, lai ņemtu vērā vecāku augšanu. Šādā gadījumā barībai tomēr visu laiku jāpaliek ieteicamajā diapazonā 0,1–0,2 mg C uz *Daphnia* dienā.

Ja vajadzīgā barības daudzuma izbarošanai ir jāizmanto tādi aizvietotāji mērījumi kā aļģu šūnu skaits vai gaismas absorbcija (t. i., ērtības labad, jo oglekļa satura mērījumi ir laikietilpīgi), katrai laboratorijai ir jāizveido savas nomogrammas, kas saista aizvietotāju mērījumu ar aļģu kultūras oglekļa saturu (padomus par nomogrammu izveidi sk. 3. papildinājumā). Nomogrammas jāpārbauda vismaz reizi gadā, un tas jādara biežāk, ja ir mainījušies aļģu kultūras apstākļi. Ir konstatēts, ka gaismas absorbcija ir labāks aizvietotājs oglekļa satura mērījumiem nekā šūnu skaits (15).

Lai līdz minimumam samazinātu aļģu kultūras vides tilpumu, ko pārnes testa traukos, *Daphnia* jāizbaro koncentrēta aļģu suspensija. Aļģu koncentrāciju var panākt ar centrifugēšanu, kam seko atkārtota suspendēšana *Daphnia* kultūras vidē.

Gaisma

16 stundas apgaismojuma, kura intensitāte nepārsniedz 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mērot uz trauka ūdens virsmas. Apgaismojuma mērīšanas instrumentiem, kas ir kalibrēti luksos, ekvivalents 1 000–1 500 lux aukstās baltās gaismas intervāls ir tuvu ieteiktajai gaismas intensitātei 15-20 μE·m–2·s–1.

Temperatūra

Testa vides temperatūrai jābūt 18–22C diapazonā. Tomēr katrā atsevišķā testā temperatūra, ja iespējams, šajās robežās nedrīkstētu mainīties vairāk kā par 2C (piemēram, 18–20 °C, 19–21 °C vai 20–22C) dienā. Var būt lietderīgi izmantot papildu testa trauku temperatūras uzraudzīšanas mērķiem.

Aerācija

Testa laikā testa traukus nedrīkst piesātināt ar gaisu.

Testa plāns

Diapazona noteikšanas tests

Nepieciešamības gadījumā diapazona noteikšanas testu veic, piemēram, ar piecām testējamo ķimikāliju koncentrācijām un diviem replikātiem katrai apstrādes un kontroles reizei. Izraugoties koncentrāciju diapazonu tā noteikšanas testam, var būt arī lietderīgi izmantot papildu informāciju no testiem ar līdzīgām ķimikālijām vai pieejamo literatūru par *Daphnia* akūto toksiskumu un/vai citiem ūdens organismiem.

Diapazona noteikšanas tests ilgst 21 dienu vai pietiekami, lai ticami prognozētu ietekmes līmeņus. Testa beigās izvērtē *Daphnia* vairošanos. Jāreģistrē vecāku skaits un pēcnācēju sastopamība.

Galīgais tests

Parasti jābūt vismaz piecām testa koncentrācijām, kuras pielīdzina efektīvai koncentrācijai (piemēram, EC_x) un kuras jāsakārto ģeometriskā kārtībā, vēlams, lai sadalījuma koeficients nepārsniegtu 3,2. Katrai testa koncentrācijai jāizmanto

▼M7

atbilstošs skaits replikātu (sk. 24.-25. punktu). Ja testē mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas ir jāpamato. Ķimikālijas testa barotnē nedrīkst testēt virs to šķīdības robežas. Pirms eksperimenta veikšanas ieteicams apsvērt testu struktūras statistisko jaudu un izmantot atbilstošas statistiskās metodes (4). Nosakot koncentrāciju diapazonu, jāpatur prātā turpmākais:

(i) ja novērtē EC_x ietekmi uz vairošanos, ieteicams izmantot pietiekami lielas koncentrācijas, lai ar atbilstīgu ticamības līmeni definētu EC_x. Izmantotajām testējamām koncentrācijām vēlams pielīdzināt aplēsto EC_x tā, lai EC_x tiktu iegūts ar interpolāciju, nevis ekstrapolāciju. Šīs statistiskās analīzes priekšrocība ir tāda, ka ir vairāk testējamo koncentrāciju (piemēram, 10) un mazāk katras koncentrācijas replikātu (piemēram, 5, tādējādi uzturot kopējo trauku skaitu nemainīgu) un ar 10 kontrolēm;

(ii) aplēšot *LOEC* un/vai *NOEC*, zemākajai testējamai koncentrācijai jābūt pietiekami zemai, lai vairošanās iznākums attiecīgajā koncentrācijā nebūtu ievērojami mazāks par kontrolē iegūto. Ja tā nav, tests jāatkārto ar samazinātu mazāko koncentrāciju;

(iii) aplēšot *LOEC* un/vai *NOEC*, augstākajai testējamai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai vairošanās iznākums attiecīgajā koncentrācijā būtu ievērojami mazāks par kontrolē iegūto. Ja tā nav, tests jāatkārto ar palielinātu augstāko koncentrāciju, ja vien maksimālā nepieciešamā testa koncentrācija hroniskas ietekmes testēšanai (t. i., 10 mg/l) sākotnējā testā netika izmantota kā augstākā testa koncentrācija.

Ja diapazona noteikšanas testā pie augstākās koncentrācijas (piemēram, pie 10 mg/l) nav novērojama ietekme vai testējamai ķimikālijai, ļoti iespējams, būs zems toksiskums/toksiskuma nebūs, balstoties uz toksiskuma trūkumu, citiem organismiem un/vai zemu/nekādu uzņemšanu, vairošanās testu var veikt kā robežtestu, izmantojot testējamo koncentrāciju, piemēram, 10 mg/l, un kontroli. Gan apstrādgrupai, gan kontrolgrupai jāizmanto desmit replikāti. Ja robežtests jāveic caurplūdes sistēmā, būs piemērots mazāks replikātu skaits. Robežtests dos iespēju pierādīt, ka robežkoncentrācijai nav statistiski būtiskas ietekmes, bet, ja tiek reģistrēta ietekme, parasti jāveic pilns tests.

Kontroles

Jāizdara viena testa barotnes kontroles testu sērija un attiecīgā gadījumā arī viena kontroles testu sērija ar šķīdinātāju vai izkliedētāju. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkliedētāju, koncentrācijai jābūt tādai pašai, kādu izmanto traukos, kuros ir testējamā ķimikālija. Jāizmanto piemērots replikātu skaits (sk. 23.-24. punktu).

Parasti labi izdarītā testā variāciju koeficientam ap dzīvo pēcteču vidējo skaitu uz vienu vecāku kontroles testā jābūt – 25 %, un tas jānorāda testa plānos, kuros izmanto atsevišķi turētus dzīvniekus.

Testa barotnes atjaunošana

Barotnes atjaunošanas biežums ir atkarīgs no testējamās ķimikālijas stabilitātes, bet barotne būtu jāatjauno vismaz trīs reizes nedēļā. Ja no iepriekšējiem stabilitātes testiem (sk. 7. punktu) ir zināms, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija nav stabila (t. i., ārpus 80–120 % diapazona no nominālās koncentrācijas vai zem 80 % no sākotnējās izmērītās koncentrācijas maksimālajā atjaunošanās laikā (t. i., trīs dienās), jāapsver, vai biežāk neatjaunot barotni vai neizmantot caurplūdes testu.

▼M7

Ja barotni atjauno pusstatiskos testos, sagatavo otru testa trauku sēriju un vecākus pārvieto uz tiem, piemēram, ar piemērota diametra stikla pipeti. Vides tilpumam, kas pārnests kopā ar *Daphnia*, jābūt iespējami mazam.

Novērojumi

Testa laikā izdarīto novērojumu rezultāti jāreģistrē datu lapās (sk. piemērus 4. un 5. papildinājumā). Ja jāveic citi mērījumi (sk. 44. punktu), var būt vajadzīgi papildu novērojumi.

Pēcnācēji

Pēcnācējus, kas radušies no katra vecāka, sākot no pirmā nārsta parādīšanās, vēlams katru dienu izņemt un saskaitīt, lai tie nevarētu patērēt barību, kas paredzēta vecākam. Šīs testēšanas metodes nolūkam ir jāskaita ne vien dzīvie pēcnācēji, bet jānorāda arī nepilnīgi attīstītās oliņas un nedzīvie pēcnācēji.

Mirstība

Vecāku mirstību vēlams reģistrēt katru dienu vai vismaz tajos pašos laikos, kad skaita pēcnācējus.

Citi parametri

Kaut arī šī testēšanas metode galvenokārt ir paredzēta, lai novērtētu ietekmi uz vairošanās iznākumu, ir iespējams, ka arī citas ietekmes var novērtēt pietiekami kvantitatīvi, lai varētu izdarīt statistisko analīzi. Vairošanās iznākumu uz izdzīvojušo vecāku, t. i., dzīvo pēcnācēju skaitu testa laikā, ko radījis viens vecāks, var reģistrēt. To var salīdzināt ar galveno atkarīgo mainīgo (vairošanās iznākums uz tādu vecāku testa sākumā, kas testa laikā nav nejauši vai netīši nomiris). Ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, piemēram, ja attiecībā pret testējamās ķimikālijas koncentrāciju novērojama būtiska atbildreakcijas regresija ar pozitīvu līknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna-Armitāža trenda testu). Ja mirstība devas–atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, no testa rezultātiem jāizslēdz. Ja mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda kā testējamās ķimikālijas ietekme un replikāti no testa rezultāta analīzes nav jāizslēdz. Augšanas mērījumi ir ļoti vēlami, jo tie informē par iespējamo subletālo ietekmi, kas var būt lietderīga papildus vairošanās pasākumiem vieniem pašiem; testa beigās ieteicams mērīt vecāku garumu (t. i., ķermeņa garumu, izņemot postabdomena nagu). Pie citiem mērāmiem vai aprēķināmiem parametriem pieder pirmo (un turpmāko) pēcnācēju radīšanai nepieciešamais laiks, nārstu skaits un apjoms uz vienu dzīvnieku, pārtraukto nārstu skaits, jaundzimušo vīrišķo pēcnācēju un efipiju esība (ESAO, 2008. gads) un iespējami populācijas pieauguma raksturīgais ātrums (definīciju sk. 1. papildinājumā, bet par jaundzimušo dzimuma identificēšanu sk. 7. papildinājumu).

Analītiskās noteikšanas un mērījumu biežums

Skābekļa koncentrācija, temperatūra, ūdens cietība un pH vērtības jāmēra vismaz ik nedēļu svaigā un vecā barotnē, kontroles testos un lielākajā testējamās ķimikālijas koncentrācijā.

Testa laikā testējamās ķimikālijas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos.

Pusstatiskos testos, ja ir sagaidāms, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija saglabāsies ± 20 % robežās no nominālā lieluma (t. i., 80–120 % diapazonā — sk. 6.,

▼M7

7. un 39. punktu), ieteicams vismaz lielākās un mazākās testa koncentrācijas analizēt svaigi pagatavotas un atjaunošanas laikā vienu reizi testa pirmās nedēļas laikā (t. i., analīzes jāizdara paraugam no tā paša šķīduma — svaigi pagatavotam un pie atjaunošanas). Šīs noteikšanas pēc tam būtu jāatkārto vismaz ik nedēļu.

Ja testā ir sagaidāms, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija nesaglabāsies ± 20 % robežās no nominālā lieluma, jāanalizē visas testējamās koncentrācijas — svaigi pagatavotas un pie atjaunošanas. Tomēr tādos testos, kuros testējamās ķimikālijas izmērītā sākotnējā koncentrācija nav ± 20 % no nominālā lieluma, bet pietiekami pierādījumi liecina, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % diapazonā no sākotnējām koncentrācijām), ķīmiskās noteikšanas var veikt tikai pie pašām lielākajām un mazākajām testējamajām koncentrācijām testa 2. un 3. nedēļā. Visos gadījumos testējamās ķimikālijas koncentrāciju noteikšana veicama pirms svaiga šķīduma pievienošanas vienā replikāta traukā katrai testējamajai koncentrācijai.

Ja izmanto caurplūdes testu, paraugus ņem līdzīgā režīmā, kā aprakstīts pusstatiskās metodes gadījumā (bet šajā gadījumā nav piemērojama "veco" šķīdumu mērīšana). Tomēr var būt ieteicams pirmajā nedēļā palielināt paraugošanas reižu skaitu (piemēram, trīs mērījumu komplekti), lai nodrošinātu, ka testējamās koncentrācijas paliek stabilas. Šāda veida testos šķīdinātāja un testējamās ķimikālijas plūsmas ātrums jāpārbauda katru dienu.

Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, tad rezultātu pamatā var būt nominālās vai izmērītās sākotnējās vērtības. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas ir lielāka par ± 20 %, rezultāti jāizsaka kā laikā svērtais vidējais lielums (norādes par aprēķiniem sk. 6. papildinājumā).

DATI UN PĀRSKATA SNIEGŠANA

Rezultātu apstrāde

Šā testa mērķis ir noteikt testējamās ķimikālijas ietekmi uz vairošanās iznākumu. Katram testa traukam (t. i., replikātam) jāaprēķina dzīvu pēcnācēju kopējais skaits uz vienu vecāku. Turklāt vairošanos var aprēķināt, pamatojoties uz izdzīvojuša vecāka organisma radītu dzīvu pēcnācēju. Tomēr ekoloģiskajā ziņā visatbilstošākais testa kritērijs ir dzīvu pēcnācēju kopējais skaits, ko radījis katrs vecāks, kurš nav nejauši ([1]) vai netīši ([2]) nomiris testa laikā. Ja vecāks nejauši vai netīši nomirst testa laikā vai, izrādās, ir vīrišķā dzimuma dzīvnieks, replikātu no analīzes izslēdz. Analīze tādā gadījumā pamatojas uz mazāku replikātu skaitu. Ja eksponētajos replikātos novērojama vecāku mirstība, jāapsver, vai mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, piemēram, ja attiecībā pret testējamās ķimikālijas koncentrāciju novērojama būtiska atbildreakcijas regresija ar pozitīvu līknes slīpumu (šim nolūkam var izmantot statistikas testu, piemēram, Kohrāna-Armitāža trenda testu). Ja mirstība devas–atbildreakcijas modelim neatbilst, replikāti, kuriem novērojama vecāku mirstība, jāizslēdz no testa rezultātiem. Ja mirstība atbilst devas–atbildreakcijas modelim, vecāku mirstība jānorāda kā testējamās ķimikālijas ietekme un replikāti no testa rezultāta analīzes nav jāizslēdz.

Rezumējot, ja ietekmes atspoguļošanai izmanto *LOEC* un *NOEC* vai EC_x, ietekmi uz vairošanos ieteicams aprēķināt, izmantojot abus iepriekš minētos atkarīgos mainīgos, t. i.,

([1]) Nejauša mirstība: nejauša notikuma (t. i., zināms iemesls) izraisīta mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju.

([2]) Netīša mirstība: mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju un kuras iemesls nav zināms.

▼M7

— dzīvu pēcnācēju kopējais skaits, ko radījis katrs vecāks, kurš nav nejauši vai netīši nomiris testa laikā; un

— viena vecāka radīto dzīvu pēcnācēju kopējais skaits;

un tad par galīgo rezultātu, kas aprēķināts, izmantojot kādu no šiem abiem atkarīgajiem mainīgajiem, izmantot zemākās *NOEC* un *LOEC* vai EC_x vērtības.

Pirms izmantot statistisko analīzi, piemēram, *ANOVA* procedūras, apstrāžu salīdzinājumu kontroles veikšanai ar Stjūdenta t-testu, Daneta testu, Viljamsa testu vai descendentu Džonkhīra-Terpstra testu, ja tas vajadzīgs konkrētā statistikas testa prasību izpildei, ieteicams apsvērt, vai dati nav jātransformē. Var apsvērt, vai neizmantot Danna vai Manna–Vitnija testus kā neparametriskas alternatīvas. Individuālo apstrāžu vidējiem rādītājiem aprēķina ticamības intervālu 95 %.

Izdzīvojušo vecāku skaits neapstrādātajās kontrolēs ir galvenais derīguma kritērijs, un tas ir jādokumentē un jānorāda pārskatā. Galīgajā pārskatā jānorāda arī visas pārējās negatīvās ietekmes, piemēram, anormāla uzvedība un toksikoloģiski būtiski konstatējumi.

ECx

ECx vērtības, tostarp ar tām saistīto zemāko un augstāko ticamības robežu, aprēķina, izmantojot piemērotas statistikas metodes (piemēram, logistisko vai Veibula funkciju, saīsināto Spīrmena-Kārbera metodi vai vienkāršu interpolāciju). Lai aprēķinātu *EC10,* EC_{50} vai jebkuru citu *ECx*, visai datu kopai jāveic regresijas analīze.

NOEC/LOEC

Ja ar statistisko analīzi paredzēts noteikt *NOEC/LOEC*, jāizmanto piemērotas statistikas metodes saskaņā ar ESAO 54. dokumentu "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (4). Parasti tiek analizēta testējamās ķimikālijas nelabvēlīgā ietekme salīdzinājumā ar kontrolgrupu, izmantojot vienpusējās hipotēzes testu ar $p \leq 0,05$.

Normālo sadalījumu un dispersijas homogenitāti var testēt ar piemērotu statistikas testu, piemēram, attiecīgi Šapiro-Vilka testu un Lēvena testu ($p \leq 0,05$). Var izmantot vienvirziena *ANOVA* un turpmākus daudzfaktoru salīdzināšanas testus. Daudzfaktoru salīdzinājumus (piemēram, Daneta testu) vai descendentus trenda testus (piemēram, Viljamsa testu vai descendenta Džonkhīra-Terpstra testu) var izmantot, lai aprēķinātu, vai starp kontrolgrupām un dažādajām testējamās ķimikālijas koncentrācijām ir statistiski būtiskas atšķirības ($p \leq 0,05$) (ieteicamā testa izraudzīšanās saskaņā ar ESAO 54. dokumentu (4)). Pretējā gadījumā *NOEC* un *LOEC* noteikšanai izmantojamas neparametriskās metodes (piemēram, Bonferoni U-tests saskaņā ar Holma vai Džonkhīra-Terpstra trenda testu).

Robežtests

Ja ir veikts robežtests (kontrolgrupas un tikai vienas apstrādgrupas salīdzinājums) un ir izpildīti parametrisko testēšanas procedūru priekšnosacījumi (normalitāte, homogenitāte), metriskās atbildreakcijas var izvērtēt ar Stjūdenta testu (t-testu). Ja šīs prasības nav izpildītas, var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testu (Velča testu) vai neparametrisku testu, piemēram, Manna–Vitnija U-testu.

Lai noteiktu būtiskas atšķirības starp kontrolgrupām (kontrolgrupu un šķīdinātāja vai izkliedētāja kontrolgrupu), katras kontrolgrupas replikātus var testēt, kā aprakstīts attiecībā uz robežtestu. Ja šajos testos netiek atklātas būtiskas atšķirības, visus kontroles un šķīdinātāja kontroles replikātus var apkopot. Citādi visas apstrādgrupas jāsalīdzina ar šķīdinātāja kontrolgrupu.

▼M7

Testēšanas pārskats

Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķimikālija:

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskās identifikācijas dati, tostarp tīrība.

Testa sugas:

— klons (vai tam ir ģenētiski noteikts tips), piegādātājs vai avots (ja tas ir zināms) un izmantotie audzēšanas apstākļi. Ja izmanto dažādas *Daphnia magna* sugas, tas jāatspoguļo un jāpamato pārskatā.

Testēšanas apstākļi:

— izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatiskā vai caurplūdes, tilpums, ievietoto *Daphnia* skaits uz litru);

— fotoperiods un gaismas intensitāte;

— testa plāns (piemēram, replikātu skaits, vecāku skaits uz replikātu);

— detalizēta informācija par izmantoto barotni;

— organiskā materiāla piedevas, ja tādas ir lietotas, tostarp to sastāvs, avots, sagatavošanas metode, izejas preparāts *TOC*/*COD*, testa barotnē iegūtā *TOC*/*COD* novērtējums;

— detalizēta informācija par barošanu, arī daudzums (mg C/*Daphnia* dienā) un grafiks (piemēram, barības veids(-i), attiecībā uz aļģēm iekļaujot specifisko (sugas) nosaukumu un, ja zināms, celmu un audzēšanas apstākļus);

— izejšķīduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (jānorāda šķīdinātājs vai izkliedētājs, ja to lieto, un tā koncentrācija).

Rezultāti:

— iepriekšēju pētījumu rezultāti par testējamās ķimikālijas stabilitāti;

— nominālās testa koncentrācijas un visu analīžu rezultāti testējamās ķimikālijas koncentrāciju noteikšanai testa traukos (datu lapu paraugu sk. 5. papildinājumā); jānorāda arī metodes atjaunošanās efektivitāte un noteikšanas robeža;

— ūdens kvalitāte testa traukos (t. i., pH, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija, un *TOC* un/vai *COD*, un attiecīgā gadījumā cietība) (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);

— visi dati par testa laikā katra vecāka radītajiem dzīvajiem pēcnācējiem (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);

— vecāku nāves gadījumu skaits un diena, kad tas noticis (datu lapas paraugu sk. 4. papildinājumā);

— vairošanās iznākuma kontroles variāciju koeficients (pamatojoties uz dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu testa beigās dzīvu vecāku);

— grafiks ar dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu vecāku katrā replikātā, izņemot visus vecākus, kas nejauši vai netīši miruši testa laikā attiecībā pret testējamās ķimikālijas koncentrāciju;

▼M7

— attiecīgā gadījumā grafiks ar dzīvo pēcnācēju kopējo skaitu uz vienu testa beigās dzīvu vecāku katrā replikātā attiecībā pret testējamās ķimikālijas koncentrāciju;

— attiecīgā gadījumā vairošanās zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*), tostarp izmantotās statistiskās procedūras apraksts un norāde par ietekmes apmēru, ko paredzēts konstatēt (lai to iegūtu, pirms eksperimenta sākuma var analizēt jaudu), un vairošanās nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*); informācija, kurai testa kritērijs, kas tika izmantots, lai aprēķinātu *LOEC* un *NOEC* vērtību (kā kopējais dzīvo pēcnācēju skaits uz mātišķo organismu, kas nejauši vai netīši nav testa laikā miris, vai kā dzīvo pēcnācēju kopējais skaits uz izdzīvojušu mātišķo organismu), attiecīgā gadījumā pārskatā jānorāda arī vecāku mirstības *LOEC* un *NOEC*;

— attiecīgā gadījumā vairošanās EC_x un ticamības intervāli (piemēram, 90 % vai 95 %) un tās aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, devas–atbildreakcijas līknes slīpums un tās standartkļūda;

— citas novērotas bioloģiskas ietekmes vai mērījumi: pārskatā jānorāda jebkādas citas novērotas vai izmērītas bioloģiskas ietekmes (piemēram, vecāku augšana), tostarp tās attiecīgi jāpamato;

— paskaidrojums par atkāpēm no testēšanas metodes.

LITERATŪRAS SARAKSTS

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 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. and 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. and 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini:

Nejauša mirstība: nejauša notikuma (t. i., zināms iemesls) izraisīta mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ECx: ūdenī izšķīdinātas testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas noteiktā ekspozīcijas laikā *Daphnia magna* vairošanos samazina par x %.

Netīša mirstība: mirstība, kas nav saistīta ar ķimikāliju un kuras iemesls nav zināms.

Populācijas pieauguma raksturīgais ātrums: populācijas augšanas mērs, kurā ietilpst vairošanās iznākums un vecumam specifiskā mirstība (1) (2) (3). Nemainīgai populācijai tas ir vienāds ar nulli. Augošai populācijai tas ir pozitīvs, un populācijai, kas samazinās, tas ir negatīvs. Protams, pēdējā minētā nav noturīga un beidzot izzūd.

Noteikšanas robeža: mazākā koncentrācija, ko var atklāt, bet ne kvantitatīvi noteikt.

Kvantitatīvās noteikšanas robeža: mazākā koncentrācija, ko var kvantitatīvi izmērīt.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*): mazākā pārbaudītā koncentrācija, ar kuru noteiktā iedarbības laikā ir novērota statistiski nozīmīga ķimikālijas ietekme uz vairošanos un vecāku mirstību (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontroli. Tomēr visām testējamām koncentrācijām, kas pārsniedz *LOEC*, jābūt ar kaitīgu iedarbību, kura ir vienāda ar vai lielāka par to, kas novērojama pie *LOEC*. Ja ir neiespējami nodrošināt šos abus nosacījumus, jāsniedz izsmeļošs skaidrojums par to, kāpēc šāda *LOEC* (un tādējādi *NOEC*) izraudzīta.

Mirstība: dzīvnieku reģistrē kā mirušu, ja tas ir nekustīgs, t. i., ja tas nepeld vai ja nav novērojamas piedēkļu vai vēderiņa aizmugures daļas kustības 15 sekunžu laikā pēc testa tvertnes vieglas pakratīšanas. (Ja izmanto citu definīciju, tā jānorāda kopā ar atsauci uz to).

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija, kas ir tieši zemāka par *LOEC* un ar kuru, salīdzinot ar kontroles mēģinājumu, noteiktā iedarbības laikā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

Pēcnācējs: jaunās *Daphnia*, ko testa gaitā radījuši vecāki.

Vecāki: *Daphnia* mātītes, kuras ir, sākot testu, un kuru vairošanās iznākums ir pētījuma objekts.

Vairošanās iznākums: dzīvu pēcnācēju skaits, ko radījis vecāks testēšanas perioda laikā.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Literatūras saraksts

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

2. papildinājums

PILNĪBĀ NOTEIKTAS *ELENDT* M7 UN M4 BAROTNES SAGATAVOŠANA

Aklimatizēšana *Elendt* M7 un M4 barotnē

Dažām laboratorijām ir bijušas grūtības, *Daphnia* tieši pārnesot M4 (1) un M7 barotnē. Tomēr zināmā mērā sekmīga var būt pakāpeniska aklimatizācija, t. i., pārnesot no dabīgās vides vispirms 30 %, pēc tam 60 % un visbeidzot 100 % *Elendt* barotnē. Aklimatizācija var ilgt līdz pat vienam mēnesim.

Sagatavošana

Mikroelementi

Vispirms piemērotas tīrības ūdenī, t. i., dejonizētā, destilētā vai ar apgriezto osmozi iegūtā ūdenī pagatavo atsevišķu mikroelementu atsevišķus izejšķīdumus (I). No šiem dažādajiem izejšķīdumiem (I) pagatavo vienu izejšķīdumu (II), kas satur visus mikroelementus (apvienoto šķīdumu), t. i.:

Izejšķīdums(i) I (atsevišķa viela)	Ūdenim pievienotais daudzums	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Lai pagatavotu apvienoto izejšķīdumu II, ūdenim pievieno šādu daudzumu izejšķīduma I	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000 reižu	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 reižu	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 reižu	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 reižu	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 reižu	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 reižu	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000 reižu	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000 reižu	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 reižu	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000 reižu	1,0	1,0
KI	65	20 000 reižu	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 reižu	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 reižu	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000 reižu	-	-
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000 reižu	-	-
Na_2EDTA un $FeSO_4$ šķīdumus pagatavo atsevišķi, apvieno un tūlīt ievieto autoklāvā. Tā iegūst:				
Fe-EDTA šķīdumu		1 000 reižu	20,0	5,0

▼**M7**

M4 un M7 barotne

M4 un M7 barotni sagatavo, izmantojot izejšķīdumu II, barības makroelementus un vitamīnus, šādi:

	Ūdenim pievienotais daudzums	Koncentrācija (attiecībā pret M4 barotni)	Barotnes sagatavošanai pievienotā izejšķīduma daudzums	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Izejšķīdums II (apvienoti mikroelementi)		20 reižu	50	50
Barības makroelementu izejšķīdumi (atsevišķa viela)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000 reižu	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000 reižu	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 reižu	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 reižu	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000 reižu	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 reižu	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 reižu	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 reižu	0,1	0,1
Vitamīnu maisījuma izejšķīdums	-	10 000 reižu	0,1	0,1

Vitamīnu maisījuma izejšķīdumu sagatavo, pievienojot trīs vitamīnus 1 litrā ūdens, šādi:

	mg/l			
Tiamīna hidrohlorīds	750	10 000 reižu		
Ciānkobalamīns (B_{12})	10	10 000 reižu		
Biotīns	7,5	10 000 reižu		

Vitamīnu maisījuma izejšķīdumu glabā sasaldētu mazās alikvotās. Vitamīnus pievieno barotnei neilgi pirms lietošanas.

NB! Lai izvairītos no sāļu izgulsnēšanās, gatavojot pilnu barotni, izejšķīdumu alikvotus pievieno apmēram 500–800 mililitriem dejonizēta ūdens un pēc tam uzpilda līdz 1 litram.

NNB! Pirmā publikācija par M4 barotni atrodama: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

3. papildinājums

KOPĒJĀ ORGANISKĀ OGLEKĻA (*TOC*) ANALĪZE UN NOMOGRAMMAS IZVEIDE *TOC* SATURAM AĻĢES SATUROŠĀ BARĪBĀ

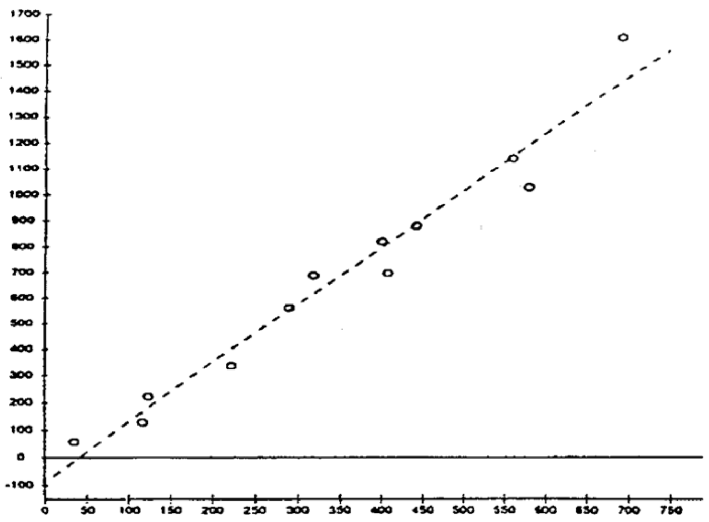
Ir atzīts, ka oglekļa saturu aļģes saturošā barībā parasti nemēra tieši, bet no korelācijām (t. i., nomogrammām) ar aizstājējiem mērījumiem, piemēram, aļģu šūnu skaitu vai gaismas absorbciju).

TOC jāmēra ar augstas temperatūras oksidācijas metodi, nevis ar UV vai persulfāta metodi. (Palīdzībai sk.: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB*.)

Nomogrammas izveidošanai aļģes atdala no augšanas vides centrifugējot, pēc tam vēlreiz suspendējot destilētā ūdenī. Katra parauga aizvietotāju parametru un *TOC* koncentrāciju mēra trijos paralēlos mērījumos. Destilēta ūdens tukšos mēģinājumus analizē un *TOC* koncentrāciju atņem no *TOC* koncentrācijas aļģu paraugos.

Vajadzīgajā oglekļa koncentrāciju diapazonā nomogrammām jābūt lineārām. Piemēri ir parādīti turpmāk.

NB! Tos nedrīkst izmantot konversijām; ir vajadzīgs, lai laboratorijas sagatavotu pašas savas nomogrammas.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

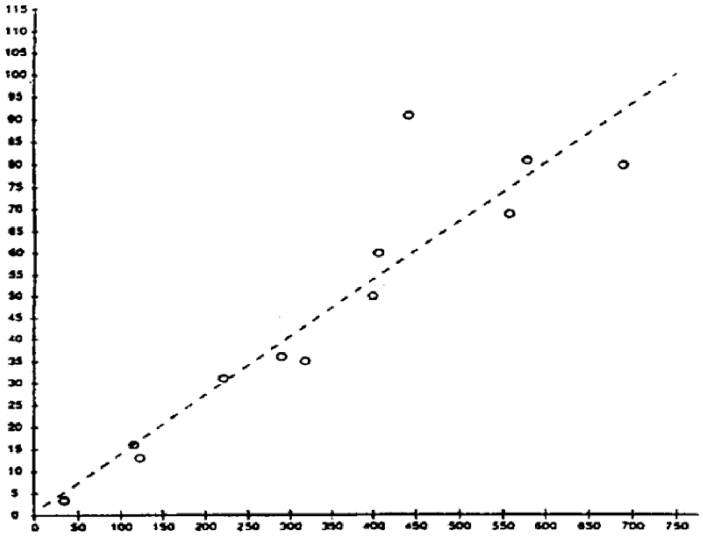
Mg/l sausā svara regresija pret mg C/1. Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/1 koncentrētas aļģes saturošas barības

Y ass: mg/1 sausā svara koncentrētas aļģes saturošas barības

Korekcijas koeficients -0,980

▼**M7**



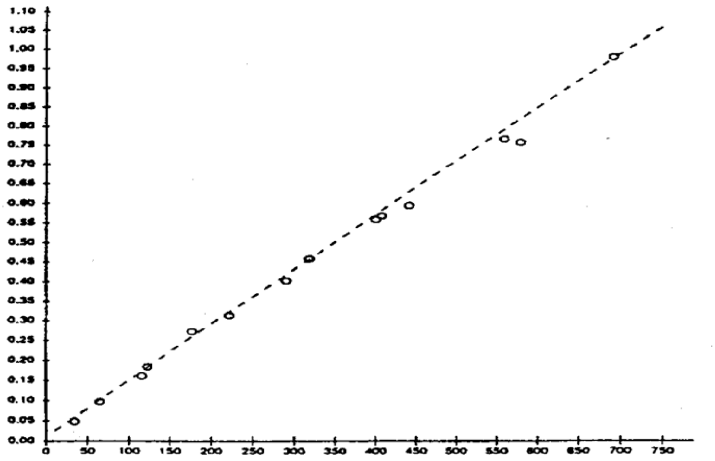
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Šūnu skaita regresija pret mg C/l. Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/1 koncentrētas aļģes saturošas barības.

Y ass: šūnu skaits/1 koncentrētas aļģes saturošas barības.

Korekcijas koeficients -0,926.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Absorbcijas regresija uz mg C/1 (1 cm ceļa garums). Dati no daļēji pārtrauktu partijas kultivēto šūnu koncentrētām suspensijām, atkārtoti suspendētām destilētā ūdenī.

X ass: mg C/1 koncentrētas aļģes saturošas barības.

Y ass: absorbcija pie 440 nm ar 1/10 koncentrētas aļģes saturošas barības atšķaidījumu.

Korekcijas koeficients -0,998.

▼M7

4. papildinājums

DATU LAPAS PARAUGS VIDES ATJAUNOŠANAS, FIZIKĀLĶĪMISKĀS MONITORĒŠANAS DATU, BAROŠANAS, *DAPHNIA* VAIROŠANĀS UN VECĀKU MIRSTĪBAS REĢISTRĒŠANAI

Eksperimenta Nr.:	Sākuma datums:						Klons:			Barotne:				Barības veids:				Testējamā ķimikālija:					Nominālā koncentrācija:	
Diena	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Barotnes atjaunošana (atzīmēt)																								
pH (*)																							jauna	
																							veca	
O_2 (mg/l) (*)																							jauna	
																							veca	
Temp (°C) (*)																							jauna	
																							vecs	
Dota barība (atzīmēt)																								
Dzīvo pēcnācēju skaits (**)																								Kopā
Trauks 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼M7

Eksperimenta Nr.:	Sākuma datums:						Klons:			Barotne:				Barības veids:				Testējamā ķimikālija:					Nominālā koncentrācija:	
Diena	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																								
																							Kopā	
Kopīgā vecāku mirstība (***)																								

(*) Norādīt, kurš trauks tika izmantots eksperimentam
(**) Apturētos nārstus attiecīgajā lodziņā norādīt kā "AB"
(***) Jebkādu vecāku mirstību attiecīgajā lodziņā norādīt kā "M".

▼M7

5. papildinājums

DATU LAPAS PARAUGS ĶĪMISKĀS ANALĪZES REZULTĀTU REĢISTRĒŠANAI

(a) **Izmērītās koncentrācijas**

Nominālā koncentrācija	1. nedēļas paraugs		2. nedēļas paraugs		3. nedēļas paraugs	
	Jaunas	Vecas	Jaunas	Vecas	Jaunas	Vecas

(b) **Izmērītās koncentrācijas kā nomināla procentuālais daudzums**

Nominālā koncentrācija	1. nedēļas paraugs		2. nedēļas paraugs		3. nedēļas paraugs	
	Jaunas	Vecas	Jaunas	Vecas	Jaunas	Vecas

▼M7

6. papildinājums

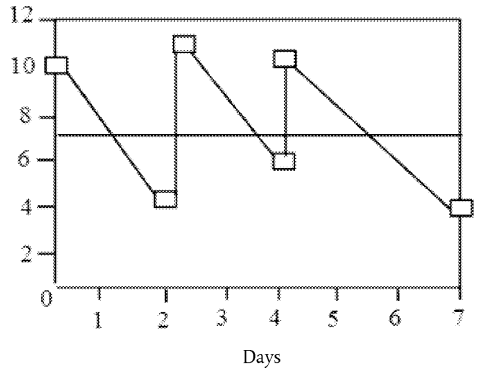
LAIKĀ SVĒRTĀ VIDĒJĀ LIELUMA APRĒĶINS

Laikā svērtais vidējais lielums

Ja laikā starp barotnes atjaunošanas reizēm testējamās ķimikālijas koncentrācija var samazināties, jāapsver, kādu koncentrāciju izraudzīties kā tādu, kas pārstāv koncentrāciju diapazonu, kuram eksponē *Daphnia* vecākus. Izvēlei jāpamatojas uz bioloģiskiem apsvērumiem, kā arī statistikas apsvērumiem. Piemēram, ja uzskata, ka vairošanos visvairāk ietekmē *Daphnia* saskare ar maksimālo koncentrāciju, jālieto maksimālā koncentrācija. Tomēr, ja uzskata, ka svarīgāka ir toksiskās ķimikālijas akumulētā vai hroniskā ietekme, atbilstošāka ir vidējā koncentrācija. Tādā gadījumā izmantošanai piemērots vidējais lielums ir laikā svērtā vidējā koncentrācija, jo tā ņem vērā koncentrācijas pārmaiņas laikā.

1. attēls

Laikā svērtā vidējā lieluma piemērs



1. attēlā norādīts (vienkāršota) testa piemērs, testam turpinoties septiņas dienas ar barotnes atjaunošanu 0., 2. un 4. dienā.

— Tievā zigzaglīnija attēlo koncentrāciju katrā laikpunktā. Tiek uzskatīts, ka koncentrācijas samazinājums seko eksponenciālam sagrūšanas procesam.

— 6 atliktie punkti apzīmē katra atjaunošanās perioda sākumā un beigās novērotās koncentrācijas.

— Resnā nepārtrauktā līnija rāda laikā svērtā vidējā lieluma novietojumu.

Laikā svērtais vidējais lielums ir aprēķināts tā, lai laukums zem laikā svērtā vidējā lieluma būtu vienāds ar laukumu zem koncentrācijas līknes. Iepriekš attēlotā piemēra aprēķins ir parādīts 1. tabulā.

1. tabula

Laikā svērtā vidējā lieluma aprēķins

Atjaunošanas Nr.	Dienas	Konc 0	Konc 1	Ln(Konc 0)	Ln(Konc 1)	Laukums
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**

Atjaunošanas Nr.	Dienas	Konc 0	Konc 1	Ln(Konc 0)	Ln(Konc 1)	Laukums
Dienas kopā:	7				Kopējais laukums:	50,092
					TW vidējais lielums:	7,156

"*Dienas*" ir dienu skaits atjaunošanas periodā.

"*Konc0*" ir katra atjaunošanas perioda sākumā izmērītā koncentrācija.

"*Konc1*" ir katra atjaunošanas perioda beigās izmērītā koncentrācija.

"*ln(Konc0)*" ir Konc0 naturāllogaritms.

"*ln(Konc1)*" ir Konc1 naturāllogaritms.

"*Laukums*" ir laukums zem katra atjaunošanas perioda eksponenciālās līknes. To aprēķina šādi:

$$Laukums = \frac{Konc\ 0 - Konc\ 1}{Ln(Konc\ 0) - Ln(Konc\ 1)} \times dienas$$

Laikā svērto vidējo lielumu ("*TW* vidējais lielums") iegūst, "Kopējo laukumu" dalot ar "Dienām kopā".

Protams, *Daphnia* vairošanās testa tabula ir jāpagarina, lai tā ietvertu 21 dienu.

Ir skaidrs — ja novērojumus veic tikai katra atjaunošanas perioda sākumā un beigās, nav iespējams apstiprināt, ka koncentrācijas samazināšanās process patiešām ir eksponenciāls. Citādai līknei būtu citāds *laukuma* aprēķins. Tomēr eksponenciāls sagrūšanas process ir ļoti ticams, un eksponenciāla līkne, iespējams, ir labākā līkne izmantošanai, ja nav citas informācijas.

Tomēr ir jābūt piesardzīgam, ja ķīmiskā analīze atjaunošanas perioda beigās neuzrāda nekādu ķimikāliju. Ja vien nav iespējams novērtēt, cik ātri ķimikālija pazūd no šķīduma, nav iespējams iegūt īstenībai atbilstošu laukumu zem līknes un tātad ir neiespējami iegūt pamatotu laikā svērto vidējo lielumu.

▼M7

7. papildinājums

NORĀDĪJUMI JAUNDZIMUŠO DZIMUMA IDENTIFICĒŠANAI

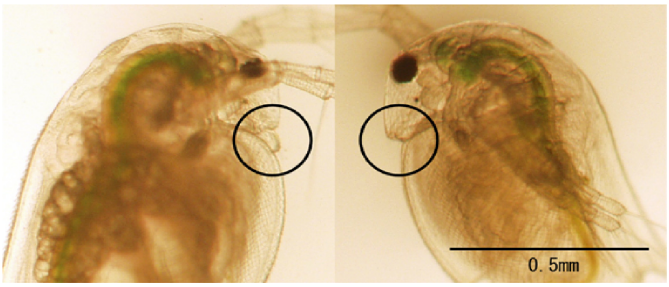
Vīrišķā dzimuma pēcnācēji var rasties, ja mainīgi ir vides apstākļi, piemēram, pie saīsināta fotoperioda, samazinātas temperatūras, samazinātas pārtikas koncentrācijas un palielināta populācijas blīvuma (*Hobaek and Larson*, 1990; *Kleiven et al*., 1992). Vīrišķā dzimuma radīšana ir arī zināma atbildreakcija uz dažiem kukaiņu augšanas regulatoriem (*Oda et al*., 2005). Apstākļos, kuros ķīmiskie stresori samazina partenoģenēzes mātīšu reproduktīvo pēcnācēju skaitu, paredzams lielāks vīrišķo pēcnācēju skaits (ESAO, 2008). Pamatojoties uz pieejamo informāciju, nav iespējams prognozēt, kurš dzimumu attiecības vai vairošanās galapunkts būs jutīgāks; tomēr ir indikatori (1. daļā atsaucē "validācijas pārskats"), ka šis vīrišķā dzimuma skaita pieaugums var būt mazāk jutīgs nekā pēcnācēju samazinājums. Tā kā šīs testēšanas metodes galvenais mērķis ir novērtēt radīto pēcnācēju skaitu, vīrišķā dzimuma pēcnācēju sastopamība ir fakultatīvs novērojums. Ja pētījumā tiek izvērtēts šis fakultatīvais beigupunkts, jāizmanto testa derīguma papildkritērijs, proti, vīrišķā dzimuma īpatņu īpatsvars kontrolēs nedrīkst pārsniegt 5 %.

Vispraktiskākais un vieglākais veids, kā izšķirt *Daphnia* dzimumus, ir izmantot to fenotipiskās īpašības, jo vīrišķā un sievišķā dzimuma īpatņi ir ģenētiski identiski un dzimums ir atkarīgs no vides apstākļiem. Vīrišķā un sievišķā dzimuma īpatņi atšķiras ar pirmā taustekli, kas vīrišķā dzimuma īpatņiem ir garāks nekā sievišķajam dzimumam, un morfoloģiski (1. attēls). Taustekļa garuma atšķirība ir atpazīstama uzreiz pēc piedzimšanas, kaut arī attīstoties izveidojas citas sekundāras dzimum īpatnības (piemēram, sk. 2. attēlu, *Olmstead and LeBlanc*, 2000).

Lai novērotu morfoloģisko dzimumu, jaundzimušie īpatņi, ko katrs testa dzīvnieks radījis, ar pipeti jāpārnes un jāievieto Petri platē ar testa barotni. Barotnē nodrošina minimālus apstākļus, lai ierobežotu dzīvnieku kustības. Pirmā taustekļa novērošanu var veikt stereomikroskopā (× 10-60).

1. attēls.

24 stundas vecs vīrišķā (pa kreisi) un sievišķā (pa labi) dzimuma *D. magna*. Vīrišķo dzimumu var atšķirt no sievišķā pēc garuma un taustekļu morfoloģijas, kā attēlā norādīts ar apļiem (*Tatarazako et al*., 2004. gads).



ATSAUCES

Hobaek A and 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., and 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 r*eproduction 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. AUGSNES MIKROORGANISMI – SLĀPEKĻA TRANSFORMĀCIJAS TESTS

1. METODE

Šī testa metode ir ESAO 216 (2000) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Šī testa metode apraksta laboratorijas metodi, kas izveidota ķīmisko vielu ilgtermiņa iedarbību izpētei uz augsnes mikroorganismu slāpekļa transformācijas aktivitāti pēc vienreizējas iedarbības. Tests galvenokārt pamatojas uz Eiropas un Vidusjūras Augu aizsardzības organizācijas ieteikumiem (1). Tomēr ir ņemti vērā arī citi norādījumi, iekļaujot Vācijas Federatīvās bioloģijas iestādes (2), ASV Vides aizsardzības aģentūras (3), Vides toksikoloģijas un ķīmijas savienības (4) un Starptautiskās Standartizācijas organizācijas (5) norādījumus. ESAO seminārā par augsnes/nogulumu atlasi, kas 1995. gadā notika Beldžiratē, Itālijā (6), vienojās par šajā testā izmantojamo augšņu skaitu un tipu. Ieteikumi par augsnes paraugu vākšanu, apstrādi un glabāšanu pamatojas uz ISO pamatnostādnēm (7) un Beldžirates semināra ieteikumiem. Pārbaudot un vērtējot testējamo vielu toksiskās īpašības, var būt jānosaka ietekmes uz augsnes mikrobu aktivitāti, piemēram, ja vajadzīgi dati par kultūraugu aizsardzības līdzekļu iespējamām blakusiedarbībām uz augsnes mikrofloru vai ja ir sagaidāma ķīmisko vielu, kas nav kultūraugu aizsardzības līdzekļi, iedarbība uz augsnes mikroorganismiem. Slāpekļa transformācijas testu izdara, lai noteiktu šādu ķīmisku vielu iedarbību uz augsnes mikrofloru. Ja agroķīmiskās vielas (piemēram, kultūraugu aizsardzības līdzekļus, mēslošanas līdzekļus, mežsaimniecības ķīmiskās vielas) pārbauda, tiek veikti slāpekļa transformācijas un oglekļa transformācijas testi. Ja pārbauda ķīmiskās vielas, kas nav agroķīmiskās vielas, pietiek ar slāpekļa transformācijas testu. Tomēr, ja EC_{50} vērtības šādu ķīmisko vielu slāpekļa transformācijas testā ir diapazonā, kas atrasts tirdzniecībā pieejamiem nitrifikācijas inhibitoriem (piemēram, nitrapirīnam), var izdarīt oglekļa transformācijas testu, lai iegūtu papildu informāciju.

Augsnes sastāv no dzīviem un nedzīviem komponentiem, kas ir sarežģītos un neviendabīgos maisījumos. Mikroorganismiem ir svarīga loma organisko vielu noārdīšanā un transformācijā auglīgās augsnēs, kurās daudzas sugas dod ieguldījumu dažādos augsnes auglības aspektos. Jebkura ilgtermiņa iejaukšanās minētajos bioķīmiskajos procesos var potenciāli iejaukties barības vielu apritē, un tas var mainīt augsnes auglību. Oglekļa un slāpekļa transformācija notiek visās auglīgās augsnēs. Kaut arī par šiem procesiem atbildīgās mikrobu kopas atšķiras starp augsnēm, transformācijas ceļi būtībā ir vieni un tie paši.

Šī aprakstītā testēšanas metode ir izveidota, lai noskaidrotu vielas ilgtermiņa kaitīgo iedarbību uz slāpekļa transformācijas procesu aerobās virsmas augsnēs. Testa metode ļauj noteikt arī vielu iedarbību uz augsnes mikrofloras veikto oglekļa transformāciju. Nitrātu veidošanās notiek pēc oglekļa–slāpekļa saišu noārdīšanas. Tātad, ja apstrādātajās un kontroles augsnēs ir konstatēti vienādi nitrātu veidošanās ātrumi, ir liela varbūtība, ka galvenie oglekļa noārdīšanās ceļi ir neskarti un funkcionāli. Testam izraudzītajam substrātam (lucernas miltu pulverim) ir labvēlīga oglekļa attiecība pret slāpekli (parasti starp 12/1 un 16/1). Tādēļ testa laikā ir samazināts oglekļa trūkums un, ja ķīmiskā viela sabojā mikrobu kopas, tās var atveseļoties 100 dienu laikā.

▼B

Testi, no kuriem ir izstrādāta šī testa metode, sākotnēji bija paredzēti vielām, kurām var noteikt augsnē nokļūstošo daudzumu. Tā tas, piemēram, ir ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, kuru lietojuma deva praksē ir zināma. Agroķīmiskajām vielām ir pietiekami testēt divas devas, kas saistītas ar sagaidāmo vai paredzamo lietojuma devu. Agroķīmiskās vielas var testēt kā aktīvās sastāvdaļas (a.s.) vai kā preparātus. Tomēr tests nav ierobežots ar agroķīmiskajām vielām. Mainot augsnē lietojamās testējamās vielas daudzumu un datu novērtēšanas veidu, testu var izmantot arī ķīmiskajām vielām, kurām nav zināms sagaidāmais augsnē nokļūstošais daudzums. Tā var noteikt koncentrāciju rindas iedarbību uz slāpekļa transformāciju vielām, kas nav agroķīmiskās vielas. Šo testu datus izmanto devas–atbildes reakcijas līknes sagatavošanai un EC_x vērtību aprēķināšanai, kur x ir definēts kā iedarbības %.

1.2. DEFINĪCIJAS

Slāpekļa transformācija: mikroorganismu veikta slāpekli saturošu organisko vielu galīgā noārdīšana amonificēšanas un nitrificēšanas procesos līdz attiecīgajam neorganiskajam galaproduktam – nitrātam.

EC_X (efektīvā koncentrācija): testējamās vielas koncentrācija augsnē, kas izraisa slāpekļa transformācijas par nitrātu kavēšanu par x procentiem.

EC_{50} (vidējā efektīvā koncentrācija): testējamās vielas koncentrācija augsnē, kas izraisa slāpekļa transformācijas par nitrātu kavēšanu par 50 procentiem (50 %).

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

1.4. TESTA METODES BŪTĪBA

Izsijātu augsni uzlabo ar augu miltu pulveri un vai nu apstrādā ar testējamo vielu, vai atstāj neapstrādātu (kontrole). Ja testē agroķīmiskas vielas, ir ieteicamas vismaz divas testa koncentrācijas, un tās jāizvēlas saistībā ar praksē sagaidāmo augstāko koncentrāciju. Pēc 0, 7, 14 un 28 inkubācijas dienām apstrādātās un kontroles augsnes paraugus ekstrahē ar piemērotu šķīdinātāju un ekstraktos nosaka nitrāta daudzumus. Nitrātu veidošanās ātrumu apstrādātajos paraugos salīdzina ar ātrumu kontroles paraugā un aprēķina apstrādāto paraugu procentuālās novirzes no kontroles parauga. Visus testus izdara vismaz 28 dienas. Ja 28. dienā apstrādātā un neapstrādātā parauga atšķirība ir vienāda vai lielāka par 25 %, mērījumus turpina ne vairāk kā līdz 100 dienām. Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskās vielas, testējamās vielas koncentrāciju rindu pievieno augsnes paraugiem un apstrādātajos paraugos un kontroles paraugā izveidojušos nitrāta daudzumus mēra pēc 28 inkubācijas dienām. Testu ar daudzkāršotām koncentrācijām rezultātus analizē, izmantojot regresijas modeli un aprēķina EC_x vērtības (t. i., EC_{50}, EC_{25} un/vai EC_{10}). Skatīt definīcijas.

1.5. TESTA DERĪGUMS

Testa ar agroķīmiskām vielām rezultātu izvērtēšana pamatojas uz relatīvi mazām atšķirībām (t. i., vidējo vērtību ± 25 %) starp nitrāta koncentrācijām kontroles un apstrādātas augsnes paraugos, tādēļ lielas kontroles mēģinājumu izmaiņas var izraisīt nepareizus rezultātus. Tādēļ izmaiņām starp kontroles paraugu atkārtojumiem jābūt mazākām par ± 15 %.

▼B

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojmus**

Izmanto ķīmiski inerta materiāla testa tvertnes. To tilpumam jāatbilst augšņu inkubācijai izmantojamām procedūrām, t. i., inkubācijai kopā vai atsevišķu augsnes paraugu virknē (skatīt 1.7.1.2. punktu). Jārūpējas, lai testa laikā iespējami samazinātu ūdens zudumu un nodrošinātu gāzu apmaiņu (piemēram, testa tvertnes var pārklāt ar perforētu polietilēna plēvi). Testējot gaistošas vielas, ir jāizmanto graduētas un gāzu necaurlaidīgas tvertnes. Tām jābūt tik lielām, lai ar augsnes paraugu būtu pildīta aptuveni viena ceturtdaļa tilpuma.

Izmanto standarta laboratorijas aprīkojumu, kurā iekļauts:

— kratīšanas ierīce – mehāniskais kratītājs vai līdzvērtīgs aprīkojums,

— centrifūga (3 000 g) vai filtrēšanas ierīce (kurā izmanto nitrātus nesaturošu filtrpapīru),

— atbilstošas jutības un atkārtojamības instruments nitrāta analīzei.

1.6.2. **Augšņu izraudzīšanās un skaits**

Izmanto vienu augsni. Ieteicamie augsnes rādītāji ir šādi:

— smilšu saturs – ne mazāks kā 50 % un ne lielāks kā 75 %,

— pH līmenis – 5,5–7,5,

— organiskā oglekļa saturs – 0,5–1,5 %,

— mikrobu biomasa ir jāizmēra (8) (9), un tās oglekļa saturam jābūt vismaz 1 % no kopējā augsnes organiskā oglekļa.

Vairumā gadījumu augsne ar šādiem rādītājiem pārstāv sliktākā gadījuma situāciju, jo testējamās ķīmiskās vielas adsorbcija ir minimāla un tās pieejamība mikroflorai ir maksimāla. Tādēļ testi ar citām augsnēm parasti nav vajadzīgi. Tomēr dažos apstākļos, piemēram, ja testējamās vielas sagaidāmā galvenā izmantošana ir īpašās augsnēs, tādās kā skābas meža augsnes, vai elektrostatiski uzlādētām ķīmiskām vielām, var būt vajadzīga papildu augsnes izmantošana.

▼B

1.6.3. **Augsnes paraugu vākšana un glabāšana**

1.6.3.1. *Vākšana*

Ir jābūt pieejamiem sīkiem datiem par tās vietas vēsturi, no kuras savākta testējamā augsne. Dati iekļauj precīzu atrašanās vietu, zemsedzi, datus par apstrādi ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, bioloģisko materiālu piedevām vai nejaušiem piesārņojumiem. Augsnes savākšanai izraudzītajai vietai jābūt ilgstoši izmantojamai. Piemērotas ir ganības, lauki ar viengadīgām graudaugu kultūrām (izņemot kukurūzu) vai blīvi apsēts zaļmēslojums. Izraudzītā paraugu ņemšanas vieta nedrīkst būt apstrādāta ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem vismaz vienu gadu pirms paraugu ņemšanas. Arī organiskie mēslošanas līdzekļi nedrīkst būt pielietoti vismaz sešus mēnešus. Minerālmēslu izmantošana ir pieņemama tikai saskaņā ar kultūraugu prasībām, un augsnes paraugus nedrīkst ņemt vismaz trīs mēnešu laikā pēc mēslošanas līdzekļa pielietošanas. Ir jāizvairās izmantot augsni, kas apstrādāta ar mēslošanas līdzekļiem ar zināmu biocīdu iedarbību (piemēram, kalcija ciānamīds).

Jāizvairās ņemt paraugus tieši pēc ilgiem sausuma vai pārplūšanas laika posmiem (ilgākiem par 30 dienām). Aramzemju paraugi jāņem no 0 līdz 20 cm dziļuma. Pļavu (ganību) vai citās augsnēs, kur aršana nenotiek ilgākos laika posmos (vismaz vienu augšanas periodu), maksimālais paraugu ņemšanas dziļums var būt nedaudz lielāks par 20 cm (piemēram, līdz 25 cm).

Augsnes paraugi ir pārvedami, izmantojot tvertnes un temperatūras apstākļos, kas garantē, ka augsnes sākotnējās īpašības nav ievērojami mainījušās.

1.6.3.2. *Glabāšana*

Vēlams izmantot augsnes, kas ir svaigi savāktas no lauka. Ja nevar izvairīties no glabāšanas laboratorijā, augsnes var glabāt tumsā 4 ± 2 °C temperatūrā ilgākais trīs mēnešus. Augšņu glabāšanas laikā jānodrošina aerobi apstākļi. Ja augsnes vāc vietās, kur tās ir sasalušas vismaz trīs mēnešus gadā, var apsvērt sešus mēnešus ilgu glabāšanu mīnus 18 °C līdz mīnus 22 °C temperatūrā. Pirms katra eksperimenta izmēra glabāto augšņu mikrobu biomasu, un oglekļa saturam biomasā jābūt vismaz 1 % no kopējā augsnes oglekļa satura (skatīt 1.6.2. punktu).

1.6.4. **Rīkošanās ar augsni un tās sagatavošana testam**

1.6.4.1. *Priekšinkubācija*

Ja augsne ir glabāta (skatīt 1.6.3.2. punktu), ir ieteicama 2 līdz 28 dienu ilga priekšinkubācija. Priekšinkubācijas laikā augsnes temperatūrai un mitruma saturam jābūt līdzvērtīgam testā izmantotajai temperatūrai un mitruma saturam (skatīt 1.6.4.2. un 1.7.1.3. punktu).

▼B

1.6.4.2. *Fizikāli ķīmiskās īpašības*

Augsni ar rokām attīra no lieliem priekšmetiem (piemēram, akmeņiem, augu daļām utt.) un pēc tam mitru sijā, pārmērīgi neizžāvējot, līdz daļiņu lielumam mazākam vai vienādam ar 2 mm. Augsnes mitruma saturs ir jākoriģē ar destilētu vai dejonizētu ūdeni līdz vērtībai no 40 % līdz 60 % no maksimālās ūdens saturēšanas spējas.

1.6.4.3. *Uzlabošana ar organisku substrātu*

Augsne ir jāuzlabo ar piemērotu organisku substrātu, piemēram, lucernas zāles zaļajiem miltiem (galvenā sastāvdaļa – *Medicago sativa*) ar C/N attiecību no 12/1 līdz 16/1. Ieteicamā lucernas attiecība pret augsni ir 5 g lucernas uz kilogramu augsnes (sausais svars).

1.6.5. **Testējamās vielas sagatavošana pielietošanai augsnē**

Testējamo vielu parasti pielieto, izmantojot nesēju. Nesējs var būt ūdens (ūdenī šķīstošām vielām) vai inerta cieta viela, tāda kā smalkas kvarca smiltis (daļiņu lielums 0,1–0,5 mm). Lietot šķidrus nesējus, izņemot ūdeni (piemēram, organiskos šķīdinātājus, tādus kā acetons, hloroforms), ir jāizvairās, jo tie var kaitēt mikroflorai. Ja par nesēju izmanto smiltis, tās var pārklāt ar testējamo vielu, kas izšķīdināta vai suspendēta piemērotā šķīdinātājā. Tādos gadījumos pirms sajaukšanas ar augsni šķīdinātājs jāaizvada iztvaicējot. Optimālam testējamās vielas sadalījumam augsnē ir ieteicama attiecība 10 g smilšu uz kilogramu augsnes (sauss svars). Kontroles paraugus apstrādā tikai ar tādu pašu daudzumu ūdens un/vai kvarca smilšu.

Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, apstrādes laikā ir iespējami jāizvairās no zudumiem un jācenšas nodrošināt viendabīgu sadalījumu augsnē (piemēram, testējamā viela ir jāinjicē augsnē vairākās vietās).

1.6.6. **Testa koncentrācijas**

Ja testē agroķīmiskas vielas, ir jāizmanto vismaz divas koncentrācijas. Mazākajai koncentrācijai jāatspoguļo vismaz maksimālais daudzums, kas prakses apstākļos, sagaidāms, nokļūs augsnē, bet lielākajai koncentrācijai jābūt mazākās koncentrācijas daudzkārtnim. Augsnei pievienojamās testējamās vielas koncentrācijas aprēķina, pieņemot, ka viela ir vienmērīgi iekļauta 5 cm dziļumā un augsnes bēruma blīvums ir 1,5. Agroķīmiskām vielām, ko pielieto tieši augsnē, vai ķīmiskām vielām, kuru augsnē nokļuvušo daudzumu var paredzēt, ieteicamās koncentrācijas ir maksimālā paredzamā koncentrācija vidē (*PEC*) un par to piecreiz lielāka koncentrācija. Vielas, ko paredzēts pielietot augsnēm vairākas reizes vienā sezonā, ir jātestē koncentrācijās, kas atvasinātas, reizinot *PEC* ar maksimālo sagaidāmo pielietošanas reižu skaitu. Lielākā testētā koncentrācija tomēr nedrīkst pārsniegt desmitkāršotu maksimālo viena lietojuma devu. Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto vismaz piecu koncentrāciju ģeometrisko rindu. Testētajām koncentrācijām ir jāiekļauj EC_x vērtības noteikšanai vajadzīgo koncentrāciju diapazons.

▼B

1.7. TESTA IZPILDE

1.7.1. **Iedarbības apstākļi**

1.7.1.1. *Apstrāde un kontrole*

Ja testē agroķīmiskas vielas, augsni sadala trijās vienāda svara daļās. Divas daļas sajauc ar nesēju, kas satur vielu, un trešo sajauc ar nesēju bez vielas (kontrole). Ir ieteicami vismaz trīs atkārtojumi gan apstrādātai, gan neapstrādātai augsnei. Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskas vielas, augsni sadala sešās vienāda svara daļās. Piecus no paraugiem sajauc ar nesēju, kas satur testējamo vielu, un sesto paraugu sajauc ar nesēju bez vielas. Ir ieteicami trīs atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Jārūpējas, lai nodrošinātu viendabīgu testējamās vielas sadalījumu apstrādātajos augsnes paraugos. Jaukšanas laikā jāizvairās augsni sablīvēt vai savelt.

1.7.1.2. *Augsnes paraugu inkubācija*

Augsnes paraugu inkubāciju var izdarīt divos veidos – inkubēt katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes kopējos paraugus vai katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes atsevišķu un vienāda lieluma apakšparaugu rindas. Tomēr, ja testē gaistošas vielas, tests jāizdara tikai ar atsevišķu paraugu rindām. Ja augsnes inkubē kopējā paraugā, sagatavo lielus katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes daudzumus un ņem analizējamos paraugus, kā testa laikā vajadzīgs. Katrai apstrādei un kontrolei sākotnēji sagatavojamais daudzums ir atkarīgs no apakšparaugu lieluma, analīzē izmantoto atkārtojumu skaita un sagaidāmā paraugu ņemšanas reižu maksimālā skaita. Kopējā paraugā inkubētās augsnes pirms apakšparaugu ņemšanas ir rūpīgi jāsajauc. Ja augsnes inkubē kā atsevišķu augsnes paraugu rindu, katru apstrādāto un neapstrādāto kopējo augsnes paraugu sadala vajadzīgajā skaitā apakšparaugu, un tos izmanto pēc vajadzības. Eksperimentos, kuros sagaidāmas vairāk par divām paraugu ņemšanas reizēm, ir jāsagatavo pietiekami daudz apakšparaugu, ņemot vērā visus atkārtojumus un visas paraugu ņemšanas reizes. Vismaz trīs testa augsnes atkārtojumu paraugi ir jāinkubē aerobos apstākļos (skatīt 1.7.1.1. punktu). Lai izvairītos no anaerobu apstākļu izveidošanās, visos testos jāizmanto piemērotas tvertnes ar pietiekamu telpu virs ūdens. Ja testē gaistošas vielas, tests jāizdara tikai ar atsevišķu paraugu rindām.

1.7.1.3. *Testa apstākļi un ilgums*

Testu izdara tumsā, istabas temperatūrā 20 ± 2 °C. Augsnes paraugu mitruma saturs testa laikā jāsaglabā no 40 % līdz 60 % no augsnes maksimālās ūdens saturēšanas spējas (skatīt 1.6.4.2. punktu) ± 5 % diapazonā. Pēc vajadzības var pievienot destilētu, dejonizētu ūdeni.

Minimālais testa ilgums ir 28 dienas. Ja testē agroķīmiskas vielas, salīdzina nitrātu veidošanās ātrumu apstrādātajos un kontroles paraugos. Ja tie 28. dienā atšķiras vairāk nekā par 25 %, testu turpina, līdz atšķirība ir vienāda ar 25 % vai mazāka par to vai maksimāli 100 dienas, atkarībā no tā, kurš no šiem lielumiem ir mazāks. Vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, testu beidz pēc 28 dienām. Divdesmit astotajā dienā nosaka nitrātu daudzumu apstrādātajā un kontroles augsnes paraugā un aprēķina EC_X vērtības.

▼B

1.7.2. **Augsnes paraugu ņemšana un analīze**

1.7.2.1. *Augsnes paraugu ņemšanas grafiks*

Ja testē agroķīmiskas vielas, augsnes paraugus analizē attiecībā uz nitrātiem 0., 7., 14. un 28. dienā. Ja vajadzīgs paildzināts tests, turpmākos mērījumus veic 14 dienu starplaikos pēc 28. dienas.

Ja testu veic vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto vismaz piecas testa koncentrācijas un augsnes paraugus analizē attiecībā uz nitrātiem iedarbības perioda sākumā (0. dienā) un beigās (28. dienā). Ja uzskata par vajadzīgu, var pievienot starpmērījumu, piemēram, 7. dienā. Datus, kas iegūti 28. dienā, izmanto EC_X vērtības noteikšanai. Ja vēlas, 0. dienas kontroles parauga datus var izmantot, lai reģistrētu nitrātu sākotnējo saturu augsnē.

1.7.2.2. *Augsnes paraugu analīze*

Katrā apstrādātajā un kontroles atkārtojumā izveidojušos nitrātu daudzumu nosaka katrā paraugu ņemšanas reizē. Nitrātu ekstrahē no augsnes, kratot paraugus ar piemērotu ekstrakcijas šķīdinātāju, piemēram, 0,1 M nātrija hlorīda šķīdumu. Ir ieteicama attiecība 5 ml KCl šķīduma uz gramu augsnes sausā svara ekvivalenta. Lai optimizētu ekstrakciju, tvertnes, kurās ir augsne un ekstrakcijas šķīdums, nedrīkst būt pilnākas par pusi. Maisījumus krata pie 150 apgr./min 60 minūtes. Maisījumus centrifugē vai filtrē un šķidro fāzi analizē attiecībā uz nitrātu. Daļiņas nesaturošus šķidros ekstraktus var pirms analīzes glabāt mīnus 20 ± 5 °C temperatūrā līdz sešiem mēnešiem.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Ja testus izdara ar agroķīmiskām vielām, katrā augsnes parauga atkārtojumā radies nitrāta daudzums jāreģistrē un visu atkārtojumu vidējās vērtības jāsniedz tabulas veidā. Slāpekļa transformācijas ātrumi ir jānovērtē ar piemērotām un vispārpieņemtām statistikas metodēm (piemēram, F-tests, 5 % nozīmības līmenis). Nitrāta daudzumus izsaka mg nitrāta/kg augsnes sausā svara dienā. Nitrāta veidošanās ātrumu katrā apstrādē salīdzina ar nitrāta veidošanās ātrumu kontrolē un aprēķina procentuālo novirzi no kontroles.

Ja testus izdara ar vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, nosaka katrā atkārtojumā radušos nitrāta daudzumu un EC_X vērtības novērtēšanai sagatavo devas–atbildes reakcijas līkni. Nitrāta daudzumus (t. i., mg nitrāta/kg augsnes sausā svara dienā), kas atrasti apstrādātajos paraugos pēc 28 dienām, salīdzina ar kontroles paraugā atrasto. No šiem datiem izrēķina kavēšanas vērtību procentos katrai testa koncentrācijai. Attiecīgos procentus atliek pret koncentrāciju un pēc tam izmanto statistikas procedūrās, lai aprēķinātu EC_x vērtības. Izmantojot standarta procedūras (10) (11) (12), nosaka arī aprēķinātās EC_x ticamības robežas (p = 0,95).

Testējamās vielas, kurās ir daudz slāpekļa, var dot ieguldījumu nitrāta daudzumā, kas radies testa laikā. Ja minētās vielas testē lielā koncentrācijā (piemēram, ķīmiskās vielas, kuras paredzēts pielietot atkārtoti), testā ir jāiekļauj attiecīga kontrole (t. i., augsne plus testējamā viela, bet bez augu miltiem). Minētās kontroles dati jāņem vērā EC_x aprēķinos.

▼B

2.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Ja vērtē testu rezultātus ar agroķīmiskām vielām un ja starpība nitrātu veidošanās ātrumā starp mazāko apstrādi (t. i., maksimālo paredzēto koncentrāciju) un kontroli ir vienāda ar 25 % vai mazāka par to jebkurā paraugu ņemšanas laikā pēc 28. dienas, ražojumu novērtēt kā tādu, kam nav ilgtermiņa iedarbības uz slāpekļa transformāciju augsnēs. Ja vērtē testu rezultātus ar vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto EC_{50}, EC_{25} un/vai EC_{10} vērtības.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

Pārskatā par testu jāiekļauj šāda informācija.

Pilnīga izmantotās augsnes identifikācija, kurā ietverta:

— vietas ģeogrāfiskā norāde (platums, garums),

— informācija par vietas vēsturi (t. i., augsega, apstrāde ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, apstrāde ar mēslošanas līdzekļiem, nejaušs piesārņojums utt.),

— izmantošanas veids (piemēram, lauksaimniecības zeme, mežs utt.),

— paraugu ņemšanas dziļums (cm),

— smilšu/sanesu/māla saturs (% no sausa svara),

— pH (ūdenī),

— organiskā oglekļa saturs (% no sausa svara),

— slāpekļa saturs (% no sausa svara),

— sākotnējā nitrāta koncentrācija (mg nitrāta/kg sausa svara),

— katjonu apmaiņas spēja (mmol/kg),

— mikrobu biomasa procentos no kopējā organiskā oglekļa,

— norāde par katra rādītāja noteikšanā izmantotajām metodēm,

— visa informācija par augsnes paraugu vākšanu un glabāšanu,

— sīki dati par augsnes priekšinkubāciju, ja tā bijusi.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, attiecīgā gadījumā iekļaujot struktūrformulu, tīrību (t. i., kultūraugu aizsardzības līdzekļiem aktīvās sastāvdaļas procentuālo daudzumu), slāpekļa saturu.

Substrāts:

— substrāta izcelsme,

— sastāvs (t. i., lucernas milti, lucernas zāles zaļie milti),

— oglekļa, slāpekļa saturs (% no sausa svara),

— sieta acu lielums (mm).

▼B

Testa apstākļi:

— sīki dati par augsnes uzlabošanu ar organisko substrātu,

— izmantotās testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju skaits un attiecīgā gadījumā izraudzīto koncentrāciju pamatojums,

— sīki dati par testējamās vielas pielietošanu augsnē,

— inkubēšanas temperatūra,

— augsnes mitruma saturs testa sākumā un testa laikā,

— izmantotā augsnes inkubēšanas metode (t. i., kopējā parauga vai atsevišķu apakšparaugu rindas),

— atkārtojumu skaits,

— paraugu ņemšanas reizes,

— nitrāta ekstrahēšanai no augsnes izmantotā metode.

Rezultāti:

— nitrāta analizēšanai izmantotā analītiskā procedūra un iekārta,

— dati, kas ierakstīti tabulā, iekļaujot nitrāta mērījumu atsevišķās un vidējās vērtības,

— atšķirības starp atkārtojumiem apstrādātajos un kontroles paraugos,

— attiecīgā gadījumā aprēķinos izdarīto korekciju skaidrojums,

— nitrātu veidošanās ātrumu procentuālās atšķirības katrā paraugu ņemšanas reizē vai attiecīgā gadījumā EC_{50} vērtība ar 95 procentu ticamības robežu, pārējās EC_x (t. i., EC_{25} vai EC_{10}) ar ticamības starplaikiem un devas–atbildes reakcijas līknes grafiku,

— rezultātu statistiskā apstrāde,

— visa informācija un novērojumi, kas noderīgi rezultātu interpretācijai.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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, Brussels.

(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: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(7) 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.

(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, p. 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. AUGSNES MIKROORGANISMI – OGLEKĻA TRANSFORMĀCIJAS TESTS

1. METODE

Šī metode ir ESAO 217 (2000) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Šī testa metode apraksta laboratorijas metodi, kas paredzēta, lai izpētītu kultūraugu aizsardzības līdzekļu un, iespējams, citu ķīmisko vielu potenciālo iedarbību uz augsnes mikroorganismu oglekļa transformācijas aktivitāti pēc vienas iedarbības reizes. Tests galvenokārt pamatojas uz Eiropas un Vidusjūras Augu aizsardzības organizācijas ieteikumiem (1). Tomēr ir ņemtas vērā arī citas pamatnostādnes, iekļaujot Vācijas Federatīvās bioloģijas iestādes (2), ASV Vides aizsardzības aģentūras (3) un Starptautiskās Standartizācijas organizācijas (4) pamatnostādnes. ESAO seminārā par augsnes/nosēdumu atlasi, kas 1995. gadā notika Beldžiratē, Itālijā (5), vienojās par šajā testā izmantojamo augšņu skaitu un tipu. Ieteikumi par augsnes paraugu vākšanu, apstrādi un glabāšanu pamatojas uz ISO pamatnostādņu dokumentu (6) un Beldžirates semināra ieteikumiem.

Pārbaudot un vērtējot testējamo vielu toksiskās īpašības, var būt jānosaka iedarbības uz augsnes mikrobu aktivitāti, piemēram, ja vajadzīgi dati par augu aizsardzības līdzekļu iespējamām blakusiedarbībām uz augsnes mikrofloru vai ja ir sagaidāma ķīmisko vielu, kas nav augu aizsardzības līdzekļi, iedarbība uz augsnes mikroorganismiem. Oglekļa transformācijas testu izdara, lai noteiktu tādu ķīmisku vielu iedarbību uz augsnes mikrofloru. Ja pārbauda agroķīmiskās vielas (piemēram, kultūraugu aizsardzības līdzekļus, mēslošanas līdzekļus, mežsaimniecības ķīmiskās vielas), tiek veikti oglekļa transformācijas un slāpekļa transformācijas testi. Ja pārbauda ķīmiskās vielas, kas nav agroķīmiskās vielas, pietiek ar slāpekļa transformācijas testu. Tomēr, ja EC_{50} vērtības šādu ķīmisko vielu slāpekļa transformācijas testā ir diapazonā, kas atrasts tirdzniecībā pieejamiem nitrifikācijas inhibitoriem (piemēram, nitrapirīnam), var izdarīt oglekļa transformācijas testu, lai iegūtu papildu informāciju.

Augsnes sastāv no dzīviem un nedzīviem komponentiem, kas pastāv sarežģītos un neviendabīgos maisījumos. Mikroorganismiem ir svarīga loma organisko vielu noārdīšanā un transformācijā auglīgās augsnēs, kurās daudzas sugas dod ieguldījumu dažādos augsnes auglības aspektos. Jebkura ilgtermiņa iejaukšanās minētajos bioķīmiskajos procesos var potenciāli iejaukties barības vielu apritē, un tas var mainīt augsnes auglību. Oglekļa un slāpekļa transformācija notiek visās auglīgās augsnēs. Kaut arī par šiem procesiem atbildīgās mikrobu kopas atšķiras starp augsnēm, transformācijas ceļi būtībā ir vieni un tie paši.

▼B

Šī testa metode ir izveidota, lai noskaidrotu vielas ilgtermiņa kaitīgo iedarbību uz oglekļa transformācijas procesu aerobās virsmas augsnēs. Tests ir jutīgs pret to mikrobu kopu lieluma un aktivitātes izmaiņām, kuras ir atbildīgas par oglekļa transformāciju, jo minētās kopas testā tiek pakļautas ķīmiskai spriedzei un oglekļa trūkumam. Izmanto smilšainu augsni ar mazu organisko vielu saturu. Attiecīgo augsni apstrādā ar testējamo vielu un inkubē apstākļos, kuros var notikt ātrs mikrobiāls metabolisms. Minētajos apstākļos viegli pieejama oglekļa avoti augsnē drīz izsīkst. Tas izraisa oglekļa trūkumu, kas nonāvē mikrobu šūnas un izraisa miera stāvokli un/vai sporu veidošanos. Ja tests ir ilgāks par 28 dienām, minēto reakciju summu var izmērīt (neapstrādātā augsnē) kontrolē kā metaboliski aktīvo mikrobu biomasas pieaugošu zudumu (7). Ja testa apstākļos ķīmiska viela iedarbojas uz biomasu augsnē, kurā ir oglekļa spriedze, biomasa var neatgriezties līdz tam pašam līmenim kā kontrole. Šā iemesla dēļ traucējumi, ko testējamā viela izraisījusi jebkurā testa laikā, bieži paliek līdz testa beigām.

Testi, no kuriem ir izveidota šī testa metode, sākotnēji bija izveidoti vielām, kurām var paredzēt augsnē nokļūstošo daudzumu. Tā tas, piemēram, ir ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, kuru lietojuma deva praksē ir zināma. Agroķīmiskajām vielām ir pietiekami testēt divas devas, kas saistītas ar sagaidāmo vai paredzamo lietojuma devu. Agroķīmiskās vielas var testēt kā aktīvās sastāvdaļas (a.s.) vai kā preparātus. Tomēr tests nav ierobežots ar ķīmiskajām vielām, kuru koncentrācija vidē ir paredzama. Mainot augsnē lietojamās testējamās vielas daudzumu un datu novērtēšanas veidu, testu var izmantot arī ķīmiskajām vielām, kurām nav zināms sagaidāmais augsnē nokļuvušais daudzums. Tā nosaka koncentrāciju rindas iedarbību uz oglekļa transformāciju vielām, kas nav agroķīmiskās vielas. Šo testu datus izmanto devas–atbildes reakcijas līknes sagatavošanai un EC_x vērtību aprēķināšanai, kur x ir noteikts kā iedarbības %.

1.2. DEFINĪCIJAS

Oglekļa transformācija: mikroorganismu veikta organisko vielu noārdīšana, veidojoties neorganiskam galaproduktam – oglekļa dioksīdam.

EC_X (efektīvā koncentrācija): testējamās vielas koncentrācija augsnē, kas izraisa oglekļa transformācijas par oglekļa dioksīdu x procentu kavēšanu.

EC_{50} (vidējā efektīvā koncentrācija): testējamās vielas koncentrācija augsnē, kas izraisa oglekļa transformācijas par oglekļa dioksīdu 50 procentu kavēšanu.

1.3. STANDARTVIELAS

Nav.

▼B

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Izsijātu augsni apstrādā ar testējamo vielu vai atstāj neapstrādātu (kontrole). Ja testē agroķīmiskas vielas, ir ieteicamas vismaz divas testa koncentrācijas, un tās jāizvēlas saistībā ar praksē sagaidāmo augstāko koncentrāciju. Pēc 0, 7, 14 un 28 inkubācijas dienām apstrādātās un kontroles augsnes paraugus sajauc ar glikozi un 12 secīgu stundu laikā mēra glikozes inducētos elpošanas ātrumus. Elpošanas ātrumus izsaka kā izdalīto oglekļa dioksīdu (mg oglekļa dioksīda/kg sausas augsnes/h) vai patērēto skābekli (mg skābekļa/kg augsnes/h). Vidējo elpošanas ātrumu apstrādātas augsnes paraugos salīdzina ar vidējo elpošanas ātrumu kontrolei un aprēķina apstrādātā parauga procentuālo atšķirību no kontroles. Visus testus turpina vismaz 28 dienas. Ja 28. dienā apstrādātā un neapstrādātā parauga atšķirība ir vienāda ar 25 % vai lielāka par to, mērījumus turpina 14 dienu starplaikos ne vairāk kā līdz 100 dienām. Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskās vielas, testējamās vielas koncentrāciju rindu pievieno augsnes paraugiem, un glikozes inducētos elpošanas ātrumus (t. i., vidējos radušos oglekļa dioksīda vai patērētā skābekļa daudzumus) mēra pēc 28 dienām. Testu ar koncentrāciju rindu rezultātus analizē, izmantojot regresijas modeli, un aprēķina EC_x vērtības (t. i., EC_{50}, EC_{25} un/vai EC_{10}). Skatīt definīcijas.

1.5. TESTA DERĪGUMS

Testa ar agroķīmiskām vielām rezultātu izvērtēšana pamatojas uz relatīvi mazām atšķirībām (t. i., vidējo vērtību ± 25 %) starp izdalīto oglekļa dioksīdu vai patērēto skābekli kontroles un apstrādātas augsnes paraugos, tādēļ lielas izmaiņas kontrolē var izraisīt nepareizus rezultātus. Tādēļ izmaiņām starp kontroles paraugu atkārtojumiem jābūt mazākām par ± 15 %.

1.6. TESTA METODES APRAKSTS

1.6.1. **Aprīkojums**

Izmanto ķīmiski inerta materiāla testa tvertnes. To tilpumam jāatbilst augšņu inkubācijā izmantojamām procedūrām, t. i., inkubācijai kopā vai atsevišķu augsnes paraugu virknē (skatīt 1.7.1.2. punktu). Jārūpējas, lai testa laikā iespējami samazinātu ūdens zudumu un nodrošinātu gāzu apmaiņu (piemēram, testa tvertnes var pārklāt ar perforētu polietilēna plēvi). Testējot gaistošas vielas, ir jāizmanto graduētas un gāzu necaurlaidīgas tvertnes. Tām jābūt tik lielām, lai ar augsnes paraugu būtu pildīta aptuveni viena ceturtdaļa tilpuma.

Glikozes inducētas elpošanas noteikšanai ir vajadzīgas inkubācijas sistēmas un oglekļa dioksīda veidošanās vai skābekļa patēriņa mērīšanas instrumenti. Šādu sistēmu un instrumentu piemēri ir atrodami literatūras sarakstā (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Augšņu izvēle un skaits**

Izmanto vienu augsni. Ieteicamie augsnes rādītāji ir šādi:

— smilšu saturs – ne mazāks kā 50 % un ne lielāks kā 75 %,

▼B

— pH līmenis – 5,5–7,5,

— organiskā oglekļa saturs – 0,5–1,5 %,

— mikrobu biomasa ir jāizmēra (12) (13), un tās oglekļa saturam jābūt vismaz 1 % no kopējā augsnes organiskā oglekļa.

Vairumā gadījumu augsne ar šādiem rādītājiem pārstāv sliktākā gadījuma situāciju, jo testējamās ķīmiskās vielas adsorbcija ir minimāla un tās pieejamība mikroflorai ir maksimāla. Tādēļ testi ar citām augsnēm parasti nav vajadzīgi. Tomēr dažos apstākļos, piemēram, ja testējamās vielas sagaidāmā galvenā izmantošana ir īpašās augsnēs, tādās kā skābas meža augsnes, vai ja ķīmiskās vielas ir elektrostatiski uzlādētas, var būt vajadzīga papildu augsnes izmantošana.

1.6.3. **Augsnes paraugu savākšana un glabāšana**

1.6.3.1. *Savākšana*

Ir jābūt pieejamai sīkai informācijai par tās vietas vēsturi, no kuras savākta testa augsne. Dati iekļauj precīzu atrašanās vietu, zemsedzi, datus par apstrādi ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, bioloģisko materiālu piedevām vai nejaušiem piesārņojumiem. Augsnes savākšanai izraudzītajai vietai jābūt ilgstoši izmantojamai. Piemērotas ir ganības, lauki ar viengadīgām graudaugu kultūrām (izņemot kukurūzu) vai blīvi apsēts zaļmēslojums. Izraudzītā paraugu ņemšanas vieta nedrīkst būt apstrādāta ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem vismaz vienu gadu pirms paraugu ņemšanas. Arī organiskie mēslošanas līdzekļi nedrīkst būt pielietoti vismaz sešus mēnešus. Minerālmēslu izmantošana ir pieņemama tikai saskaņā ar kultūraugu prasībām, un augsnes paraugus nedrīkst ņemt vismaz trīs mēnešu laikā pēc mēslošanas līdzekļa pielietošanas. Ir jāizvairās izmantot augsni, kas apstrādāta ar mēslošanas līdzekļiem ar zināmu biocīdu iedarbību (piemēram, kalcija ciānamīds).

Jāizvairās ņemt paraugus tieši pēc ilgiem sausuma vai pārplūšanas laika posmiem (ilgākiem par 30 dienām). Aramzemju paraugi jāņem no 0 līdz 20 cm dziļuma. Pļavu (ganību) vai citām augsnēs, kur aršana nenotiek ilgākos laika posmos (vismaz vienu augšanas periodu), maksimālais paraugu ņemšanas dziļums var būt nedaudz lielāks par 20 cm (piemēram, līdz 25 cm). Augsnes paraugi jāpārvadā, izmantojot tvertnes un temperatūras apstākļos, kas garantē, ka augsnes sākotnējās īpašības nav ievērojami mainījušās.

1.6.3.2. *Glabāšana*

Vēlams izmantot augsnes, kas ir svaigi savāktas no lauka. Ja nevar izvairīties no glabāšanas laboratorijā, augsnes var glabāt tumsā 4 ± 2 ^{o}C temperatūrā ilgākais trīs mēnešus. Augšņu glabāšanas laikā jānodrošina aerobi apstākļi. Ja augsnes vāc vietās, kur tās ir sasalušas vismaz trīs mēnešus gadā, var apsvērt sešus mēnešus ilgu glabāšanu mīnus 18 ^{o}C temperatūrā. Pirms katra eksperimenta izmērī glabāto augšņu mikrobu biomasu, un oglekļa saturam biomasā jābūt vismaz 1 % no kopējā augsnes oglekļa satura (skatīt 1.6.2. punktu).

▼B

1.6.4. **Augsnes apstrāde un tās sagatavošana testam**

1.6.4.1. *Priekšinkubācija*

Ja augsne ir glabāta (skatīt 1.6.4.2. un 1.7.1.3. punktu), ir ieteicama 2 līdz 28 dienu ilga priekšinkubācija. Priekšinkubācijas laikā augsnes temperatūrai un mitruma saturam jābūt līdzīgam testā izmantotajai temperatūrai un mitruma saturam (skatīt 1.6.4.2. un 1.7.1.3. punktu).

1.6.4.2. *Fizikāli ķīmiskās īpašības*

Augsni ar rokām attīra no lieliem priekšmetiem (piemēram, akmeņiem, augu daļām utt.) un pēc tam mitru sijā, pārmērīgi neizžāvējot, līdz daļiņu lielumam, mazākam vai vienādam ar 2 mm. Augsnes mitruma saturs ir jākoriģē ar destilētu vai dejonizētu ūdeni līdz vērtībai no 40 % līdz 60 % no maksimālās ūdens saturēšanas spējas.

1.6.5. **Testējamās vielas sagatavošana pielietošanai augsnē**

Testējamo vielu parasti pielieto, izmantojot nesēju. Nesējs var būt ūdens (ūdenī šķīstošām vielām) vai inerta cieta viela, tāda kā smalkas kvarca smiltis (daļiņu lielums – 0,1–0,5 mm). Lietot šķidrus nesējus, izņemot ūdeni (piemēram, organiskos šķīdinātājus, tādus kā acetons, hloroforms), ir jāizvairās, jo tie var kaitēt mikroflorai. Ja par nesēju izmanto smiltis, tās var pārklāt ar testējamo vielu, kas izšķīdināta vai suspendēta piemērotā šķīdinātājā. Tādos gadījumos pirms sajaukšanas ar augsni šķīdinātājs jāaizvada iztvaicējot. Optimālam testējamās vielas sadalījumam augsnē ir ieteicama attiecība 10 g smilšu uz kilogramu augsnes (sauss svars). Kontroles paraugus apstrādā tikai ar tādu pašu daudzumu ūdens un/vai kvarca smilšu.

Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, apstrādes laikā ir iespējami jāizvairās no zudumiem un jācenšas nodrošināt viendabīgu sadalījumu augsnē (piemēram, testējamā viela ir jāinjicē augsnē vairākās vietās).

1.6.6. **Testa koncentrācijas**

Ja testē kultūraugu aizsardzības produktus vai citas ķīmiskās vielas ar paredzamām koncentrācijām vidē, ir jāizmanto vismaz divas koncentrācijas. Mazākajai koncentrācijai jāatspoguļo vismaz maksimālais daudzums, kas praktiskos apstākļos, sagaidāms, nokļūs augsnē, bet lielākajai koncentrācijai jābūt mazākās koncentrācijas daudzkārtnim. Augsnei pievienotās testējamās vielas koncentrācijas aprēķina, pieņemot, ka viela ir vienmērīgi iestrādāta 5 cm dziļumā un augsnes bēruma blīvums ir 1,5. Agroķīmiskām vielām, ko pielieto tieši augsnē, vai ķīmiskām vielām, kuru augsnē nokļuvušo daudzumu var paredzēt, ieteicamās koncentrācijas ir paredzamā koncentrācija vidē (*PEC*) un par to piecreiz lielāka koncentrācija. Vielas, ko paredzēts pielietot augsnēm vairākas reizes vienā sezonā, ir jātestē koncentrācijās, kas atvasinātas, reizinot *PEC* ar maksimālo sagaidāmo pielietošanas reižu skaitu. Lielākā testētā koncentrācija tomēr nedrīkst pārsniegt desmitkāršotu maksimālo viena lietojuma devu.

Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto vismaz piecu koncentrāciju ģeometrisko rindu. Testētajām koncentrācijām ir jāiekļauj EC_x vērtības noteikšanai vajadzīgo koncentrāciju diapazons.

▼B

1.7. TESTA NORISE

1.7.1. **Iedarbības apstākļi**

1.7.1.1. *Iedarbības apstākļi*

Ja testē agroķīmiskas vielas, augsni sadala trijās vienāda svara daļās. Divas daļas sajauc ar nesēju, kas satur vielu, un trešo sajauc ar nesēju bez vielas (kontrole). Ir ieteicami vismaz trīs atkārtojumi gan apstrādātai, gan neapstrādātai augsnei. Ja testē vielas, kas nav agroķīmiskas vielas, augsni sadala sešās vienāda svara daļās. Piecus no paraugiem sajauc ar nesēju, kas satur testējamo vielu, un sesto paraugu sajauc ar nesēju bez vielas. Ir ieteicami trīs atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Jārūpējas, lai nodrošinātu vienmērīgu testējamās vielas sadalījumu apstrādātajos augsnes paraugos. Jaukšanas laikā jāizvairās augsni sablīvēt vai savelt.

1.7.1.2. *Augsnes paraugu inkubācija*

Augsnes paraugu inkubāciju var izdarīt divos veidos – katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes kopējiem paraugiem vai katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes atsevišķu un vienāda lieluma apakšparaugu rindām. Tomēr, ja testē gaistošas vielas, tests jāizdara tikai ar atsevišķu paraugu rindām. Ja augsnes inkubē kopējā paraugā, sagatavo lielus katras apstrādātās un neapstrādātās augsnes daudzumus un ņem analizējamos paraugus, kā testa laikā vajadzīgs. Katrai apstrādei un kontrolei sākotnēji sagatavojamais daudzums ir atkarīgs no apakšparaugu lieluma, analīzē izmantoto atkārtojumu skaita un sagaidāmā paraugu ņemšanas reižu maksimālā skaita. Kopējā paraugā inkubētās augsnes pirms apakšparaugu ņemšanas ir rūpīgi jāsajauc. Ja augsnes inkubē kā atsevišķu augsnes paraugu rindu, katru apstrādāto un neapstrādāto kopējo augsnes paraugu sadala vajadzīgajā skaitā apakšparaugu un tos izmanto pēc vajadzības. Eksperimentos, kuros sagaidāmas vairāk par divām paraugu ņemšanas reizēm, ir jāsagatavo pietiekami daudz apakšparaugu, ņemot vērā visus atkārtojumus un visas paraugu ņemšanas reizes. Vismaz trīs testa augsnes atkārtojumu paraugi ir jāinkubē aerobos apstākļos (skatīt 1.7.1.1. punktu). Lai izvairītos no anaerobu apstākļu izveidošanās, visos testos jāizmanto piemērotas tvertnes ar pietiekamu tukšo telpu. Ja testē gaistošas vielas, tests jāizdara tikai ar atsevišķu paraugu rindām.

1.7.1.3. *Testa apstākļi un ilgums*

Testu izdara tumsā, istabas temperatūrā 20 ± 2 °C. Augsnes paraugu mitruma saturs testa laikā jāsaglabā no 40 % līdz 60 % no augsnes maksimālās ūdens saturēšanas spējas (skatīt 1.6.4.2. punktu) ± 5 % diapazonā. Pēc vajadzības var pievienot destilētu, dejonizētu ūdeni.

Minimālais testa ilgums ir 28 dienas. Ja testē agroķīmiskas vielas, salīdzina izdalītā oglekļa dioksīda vai patērētā skābekļa daudzumus apstrādātajos un kontroles paraugos. Ja tie 28. dienā atšķiras vairāk nekā par 25 %, testu turpina, līdz atšķirība ir vienāda ar 25 % vai mazāka par to vai maksimāli 100 dienas, atkarībā no tā, kurš no šiem lielumiem ir mazāks. Vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, testu beidz pēc 28 dienām. 28. dienā nosaka izdalītā oglekļa dioksīda vai patērētā skābekļa daudzumu apstrādātajā un kontroles augsnes paraugā un aprēķina EC_X vērtības.

▼B

1.7.2. **Augsnes paraugu ņemšana un analīze**

1.7.2.1. *Augsnes paraugu ņemšanas grafiks*

Ja testē agroķīmiskas vielas, augsnes paraugus analizē attiecībā uz glikozes inducētas elpošanas ātrumiem 0., 7., 14. un 28. dienā. Ja vajadzīgs paildzināts tests, turpmākos mērījumus veic 14 dienu starplaikos pēc 28. dienas.

Ja testu veic vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto vismaz piecas testa koncentrācijas un augsnes paraugus analizē attiecībā uz glikozes inducētas elpošanas ātrumiem iedarbības perioda sākumā (0. dienā) un beigās (28. dienā). Ja uzskata par vajadzīgu, var pievienot starpmērījumu, piemēram, 7. dienā. Datus, kas iegūti 28. dienā, izmanto EC_x vērtības noteikšanai. Ja vēlas, 0. dienas kontroles parauga datus var izmantot, lai noteiktu metaboliski aktīvu mikrobu biomasas sākotnējo saturu augsnē (12).

1.7.2.2. *Glikozes inducētas elpošanas ātrumu mērīšana*

Katrā apstrādātajā un kontroles atkārtojumā glikozes inducētas elpošanas ātrumu nosaka katrā paraugu ņemšanas reizē. Augsnes paraugus sajauc ar pietiekamu daudzumu glikozes, lai izraisītu maksimālo elpošanas atbildes reakciju. Glikozes daudzumu, kas vajadzīgs maksimālās elpošanas atbildes reakcijas izraisīšanai no konkrētās augsnes, var noteikt priekštestā, izmantojot glikozes koncentrāciju rindu (14). Tomēr smilšainām augsnēm ar 0,5–1,5 % organiskā oglekļa parasti pietiek 2 000 mg līdz 4 000 mg glikozes uz kg augsnes sausā svara. Glikozi var samalt pulverī ar tīrām kvarca smiltīm (10 g smilšu/kg augsnes sausā svara) un vienmērīgi sajaukt ar augsni.

Ar glikozi uzlabotus augsnes paraugus 20 ± 2 °C temperatūrā inkubē aparātā, kas piemērots elpošanas ātrumu mērīšanai nepārtraukti, katru stundu vai katras divas stundas (skatīt 1.6.1. punktu). Izdalīto oglekļa dioksīdu vai patērēto skābekli mēra 12 secīgas stundas, un mērījumi jāuzsāk iespējami drīz, t. i., 1 līdz 2 stundas pēc glikozes pievienošanas. Mēra kopējo izdalītā oglekļa dioksīda vai patērētā skābekļa daudzumu 12 stundu laikā un nosaka vidējos elpošanas ātrumus.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Ja testus izdara ar agroķīmiskām vielām, katrā augsnes parauga atkārtojumā izdalītā oglekļa dioksīda vai patērētā skābekļa daudzums jāreģistrē, un visu atkārtojumu vidējās vērtības jāsniedz tabulas veidā. Rezultāti ir jānovērtē ar piemērotām un vispārpieņemtām statistikas metodēm (piemēram, F-testu, 5 % nozīmības līmeni). Glikozes inducētās elpošanas ātrumus izsaka mg oglekļa dioksīda/kg augsnes sausā svara/h. Vidējo oglekļa dioksīda izdalīšanās vai skābekļa patēriņa ātrumu katrā apstrādē salīdzina ar oglekļa dioksīda izdalīšanās vai skābekļa patēriņa ātrumu kontrolē un aprēķina procentuālo novirzi no kontroles.

▼B

Ja testus izdara ar vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, nosaka katrā atkārtojumā izdalīto oglekļa dioksīda vai patērēto skābekļa daudzumu un EC_x vērtības novērtēšanai sagatavo devas–atbildes reakcijas līkni. Glikozes inducētās elpošanas ātrumus (t. i., mg oglekļa dioksīda/kg sausā svara augsnes/h vai mg skābekļa/kg sausā svara augsnes/h), kas konstatēti apstrādātajiem paraugiem pēc 28 dienām, salīdzina ar kontrolē konstatētajiem. No šiem datiem izrēķina kavēšanas vērtību procentos katrai testa koncentrācijai. Attiecīgos procentus atliek pret koncentrāciju un izmanto statistikas procedūras, lai aprēķinātu EC_x vērtības. Izmantojot standarta procedūras (15) (16) (17), nosaka arī aprēķinātās EC_x ticamības robežas ($p = 0,95$).

2.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Ja vērtē testu rezultātus ar agroķīmiskām vielām un ja starpība elpošanas ātrumā starp mazāko apstrādi (t. i., maksimālo paredzēto koncentrāciju) un kontroli ir vienāda ar 25 % vai mazāka par to jebkurā paraugu ņemšanas laikā pēc 28. dienas, var novērtēt, ka ražojumam nav ilgtermiņa ietekmes uz oglekļa transformāciju augsnēs. Ja vērtē testu rezultātus ar vielām, kas nav agroķīmiskas vielas, izmanto EC_{50}, EC_{25} un/vai EC_{10} vērtības.

3. PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jābūt iekļautai šādai informācijai.

Pilnīga izmantotās augsnes identifikācija, kurā iekļauta:

— vietas ģeogrāfiskā norāde (garums, platums),

— informācija par vietas vēsturi (t. i., augsega, apstrāde ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, apstrāde ar mēslošanas līdzekļiem, nejaušs piesārņojums utt.),

— izmantošanas veids (piemēram, lauksaimniecības zeme, mežs utt.),

— paraugu ņemšanas dziļums (cm),

— smilšu/sanesu/māla saturs (% no sausa svara),

— pH (ūdenī),

— organiskā oglekļa saturs (% no sausa svara),

— slāpekļa saturs (% no sausa svara),

— katjonu apmaiņas spēja (mmol/kg),

— sākotnējā mikrobu biomasa procentos no kopējā organiskā oglekļa,

— norāde par katra rādītāja noteikšanā izmantotajām metodēm,

— visa informācija par augsnes paraugu vākšanu un glabāšanu,

— sīki dati par augsnes priekšinkubāciju, ja tā bijusi.

▼B

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības,

— ķīmiskās identifikācijas dati, attiecīgā gadījumā iekļaujot struktūras formulu, tīrību (t. i., kultūraugu aizsardzības līdzekļiem aktīvās sastāvdaļas procentuālo daudzumu), slāpekļa saturu.

Testa apstākļi:

— sīki dati par augsnes uzlabošanu ar organisko substrātu,

— izmantotās testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju skaits un attiecīgā gadījumā izraudzīto koncentrāciju pamatojums,

— sīki dati par testējamās vielas pielietošanu augsnē,

— inkubācijas temperatūra,

— augsnes mitruma saturs testa sākumā un testa laikā,

— izmantotā augsnes inkubācijas metode (t. i., kopējam paraugam vai atsevišķu apakšparaugu rindai),

— atkārtojumu skaits,

— paraugu ņemšanas reizes.

Rezultāti:

— elpošanas ātruma mērīšanai izmantotā metode un iekārta,

— tabulas veidā apkopoti dati, iekļaujot oglekļa dioksīda vai skābekļa daudzumu atsevišķās un vidējās vērtības,

— atšķirības starp atkārtojumiem apstrādātajos un kontroles paraugos,

— attiecīgā gadījumā aprēķinos izdarīto korekciju skaidrojums,

— glikozes inducētās elpošanas ātrumu procentuālās atšķirības katrā paraugu ņemšanas reizē vai attiecīgā gadījumā EC_{50} vērtība ar 95 procentu ticamības robežu, pārējās EC_x (t. i., EC_{25} vai EC_{10}) ar ticamības starplaikiem un devas–atbildes reakcijas līknes grafika,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— visa informācija un novērojumi, kas noderīgi rezultātu interpretācijai.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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 N° 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). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber 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, p. 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. **AEROBĀ UN ANAEROBĀ TRANSFORMĀCIJA AUGSNĒ**

1. **METODE**

Šī testa metode ir ESAO 307 (2002) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Šī testa metode pamatojas uz esošajām pamatnostādnēm (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šajā testa metodē aprakstītā metode ir paredzēta ķīmisko vielu aerobās un anaerobās transformācijas augsnē novērtēšanai. Eksperimentus veic, lai noteiktu – i) testējamās vielas transformācijas ātrumu un ii) transformācijas produktu, kas var iedarboties uz augiem un augsnes organismiem, īpašības un veidošanās un samazināšanās ātrumu. Tādi pētījumi ir vajadzīgi par ķīmiskajām vielām, ko tieši pielieto augsnē vai kas varētu nokļūt augsnes vidē. Tādus laboratorijas pētījumu rezultātus var arī izmantot, lai izveidotu paraugu ņemšanas un analīzes protokolus ar pētījumiem saistītās jomās.

Lai novērtētu transformācijas ceļus, parasti pietiek ar aerobiem un anaerobiem pētījumiem ar vienu augsnes tipu (8) (10) (11). Transformācijas ātrumi ir jānosaka vismaz trīs papildu augsnēs (8) (10).

ESAO seminārā par augsnes un nosēdumu atlasi, kas 1995. gadā notika Beldžiratē, Itālijā (10), vienojās jo īpaši par šajā testā izmantojamo augšņu skaitu un tipu. Testēto augšņu tipiem jābūt reprezentatīviem attiecībā uz vides apstākļiem, kuros notiek izmantošana vai izlaišana. Piemēram, ķīmiskās vielas, ko var izlaist subtropiskajā vai tropiskajā klimatā, ir jātestē ar *Ferrasols* vai *Nitosols* (FAO sistēma). Seminārs arī sniedza ieteikumus attiecībā uz augsnes paraugu vākšanu, apstrādi un glabāšanu, pamatojoties uz ISO pamatnostādnēm (15). Šajā metodē ir apsvērta arī rīsa augšņu izmantošana.

1.2. DEFINĪCIJAS

Testējamā viela: jebkura viela, gan izejas savienojums, gan attiecīgie transformācijas produkti.

Transformācijas produkti: visas vielas, kas rodas testējamās vielas biotiskās vai abiotiskās transformācijas reakcijās, iekļaujot CO_2 un produktus, kas ir saistītās nogulsnēs.

Saistītās nogulsnes: "saistītās nogulsnes" ir vielas augsnē, augos vai dzīvniekos, kuras ir noturīgas matricā izejas savienojuma vai tā metabolītu/transformācijas produktu veidā pēc ekstrakcijas. Ekstrakcijas metode nedrīkst būtiski mainīt pašus savienojumus vai matricas struktūru. Saistības veidu var noskaidrot daļēji ar matricu mainošām ekstrakcijas metodēm un sarežģītām analīzes metodēm. Līdz šim, piemēram, šādā veidā ir identificētas kovalentās, jonu un sorbcijas saites, kā arī ieslēgumi. Parasti saistīto nogulšņu veidošanās ievērojami samazina bioloģisko pieejamību un bioloģiski pieejamo daudzumu (12) (Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība – modificēts 1984. gadā (13)).

Aerobā transformācija: reakcijas, kas notiek molekulārā skābekļa klātbūtnē (14).

▼B

Anaerobā transformācija: reakcijas, kas notiek, izslēdzot molekulārā skābekļa klātbūtni.

Augsne: mazu organismu (galvenokārt mikroorganismu) apdzīvots neorganisku un organisku ķīmisko sastāvdaļu maisījums, pēdējās minētās satur savienojumus ar lielu oglekļa un slāpekļa saturu un lielu molekulsvaru. Ar augsni var rīkoties divos stāvokļos:

a) neskartu, kā tā laika gaitā ir izveidojusies raksturīgos dažādu augšņu tipu slāņos;

b) skartu, kā tā parasti ir atrodama aramzemē vai kā tas notiek, ja rokot vāc paraugus un izmanto šajā testa metodē (14).

Mineralizācija: pilnīga organisko savienojumu noārdīšana līdz CO_2 un H_2O aerobos apstākļos un līdz CH_4, CO_2 un H_2O anaerobos apstākļos. Šīs testa metodes kontekstā, ja izmanto ar ^{14}C marķētu savienojumu, mineralizācija nozīmē intensīvu noārdīšanos, kuras laikā marķētā oglekļa atomi oksidējas, izdalot attiecīgu daudzumu $^{14}CO_2$ (14).

Pussabrukšanas periods: $t_{0,5}$ ir laiks, kas vajadzīgs, lai transformētu 50 % testējamās vielas, ja transformāciju var aprakstīt pirmās kārtas kinētika; tas nav atkarīgs no koncentrācijas.

DT_{50} (izzušanas laiks 50): laiks, kurā testējamās vielas koncentrācija samazinās par 50 %; tas ir atšķirīgs no pussabrukšanas perioda $t_{0,5}$, ja transformācija nenotiek saskaņā ar pirmās kārtas kinētiku.

DT_{75} (izzušanas laiks 75): laiks, kurā testējamās vielas koncentrācija samazinās par 75 %.

DT_{90} (izzušanas laiks 90): laiks, kurā testējamās vielas koncentrācija samazinās par 90 %.

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas jāizmanto transformācijas produktu raksturošanai un/vai identifikācijai ar spektroskopijas un hromatogrāfijas metodēm.

1.4. TESTA PIEMĒROJAMĪBA

Metode ir derīga visām ķīmiskajām vielām (nemarķētām vai radioaktīvi marķētām), kurām ir pieejama pietiekami precīza un jutīga analīzes metode. Tā ir derīga nedaudz gaistošiem, negaistošiem, ūdenī šķīstošiem vai ūdenī nešķīstošiem savienojumiem. Tests nav jāpielieto ķīmiskajām vielām, kas ir ļoti gaistošas no augsnes (piemēram, fumigantiem, organiskajiem šķīdinātājiem), un tādēļ šā testa eksperimenta apstākļos nav saglabājamas augsnē.

▼B

1.5. INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Transformācijas ātruma mērīšanai var izmantot nemarķētas vai marķētas vielas. Marķēts materiāls ir vajadzīgs, lai pētītu transformācijas ceļu un noteiktu masas bilanci. Ir ieteicama marķēšana ar ^{14}C, bet noderīga var būt arī citu izotopu, tādu kā ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P izmantošana. Cik iespējams, marķējums jānovieto molekulas stabilākajā(-ās) daļā(-ās). Testējamās vielas tīrībai jābūt vismaz 95 %.

Pirms aerobās un anaerobās transformācijas augsnē testa izdarīšanas vajadzīga šāda informācija par testējamo vielu:

a) šķīdība ūdenī (A.6. metode);

b) šķīdība organiskajos šķīdinātājos;

c) tvaika spiediens (A.4. metode) un Henrija likuma konstante;

d) sadalījuma koeficients sistēmā n-oktanols/ūdens (A.8. metode);

e) ķīmiskā stabilitāte tumsā (hidrolīze) (C.7. metode);

f) pK_a, ja molekula protonējas vai deprotonējas (ESAO 112. vadlīnija) (16).

Citā noderīgā informācijā var iekļaut datus par testējamās vielas toksicitāti attiecībā uz augsnes mikroorganismiem (C.21. un C.22. testa metode) (16).

Jābūt pieejamām analīzes metodēm (iekļaujot ekstrakciju un attīrīšanas metodes) testējamās vielas un tās transformācijas produktu kvantitatīvai noteikšanai un identifikācijai.

1.6. TESTA METODES PRINCIPS

Augsnes paraugus apstrādā ar testējamo vielu un inkubē tumsā biometra veida kolbās vai caurplūdes sistēmās kontrolētos laboratorijas apstākļos (nemainīgā temperatūrā un augsnes mitrumā). Piemērotos starplaikos augsnes paraugus ekstrahē un analizē attiecībā uz izejas savienojumu un transformācijas produktiem. Analīzei savāc arī gaistošos produktus, izmantojot piemērotas absorbcijas ierīces. Izmantojot ar ^{14}C marķētu materiālu, var izmērīt dažādus testējamās vielas mineralizācijas ātrumus, uztverot radušos $^{14}CO_2$, un noteikt masas bilanci, iekļaujot augsnes saistītās nogulsnes.

1.7. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.7.1. **Atgūstamība**

Vismaz divu paralēlu augsnes paraugu ekstrahēšana un analīze tieši pēc testējamās vielas pievienošanas dod pirmo norādi par analīzes metodes atkārtojamību un pielietojamās procedūras vienādību testējamai vielai. Atgūstamību eksperimentu vēlākiem posmiem iegūst no attiecīgajām masas bilancēm. Atgūstamībai jābūt diapazonā no 90 % līdz 110 % marķētām ķīmiskām vielām (8) un no 70 % līdz 110 % nemarķētām ķīmiskām vielām (3).

▼B

1.7.2. **Analīzes metodes atkārtojamība un jutība**

Analīzes metodes atkārtojamību (izņemot sākotnējās ekstrahēšanas efektivitāti), kvantitatīvi nosakot testējamās vielas un transformācijas produktu, var pārbaudīt, veicot divas paralēlas analīzes vienam un tam pašam augsnes ekstraktam, kas ir pietiekami inkubēts, lai veidotos transformācijas produkts.

Analītiskās metodes kvalitatīvās noteikšanas robežai (KNR) attiecībā uz testējamo vielu un transformācijas produktiem jābūt vismaz 0,01 $mg.kg^{-1}$ augsnes (kā testējamai vielai) vai 1 % no pielietotās devas, atkarībā no tā, kurš lielums ir mazāks. Ir jānorāda arī kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*).

1.7.3. **Transformācijas datu precizitāte**

Testējamās vielas koncentrācijas kā laika funkcijas regresijas analīze sniedz attiecīgu informāciju par transformācijas līknes ticamību un ļauj aprēķināt pussabrukšanas perioda ticamības robežas (pseido pirmās kārtas kinētikas gadījumā) vai DT_{50} vērtības un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} vērtības.

1.8. TESTA METODES APRAKSTS

1.8.1. **Aprīkojums un ķīmiskie reaģenti**

Inkubācijas sistēmas sastāv no statiskām noslēgtām sistēmām vai piemērotām caurplūdes sistēmām (7) (17). Piemērotu caurplūdes augsnes inkubācijas aparātu un biometra tipa kolbu piemēri ir attiecīgi parādīti 1. un 2. attēlā. Abu veidu inkubācijas sistēmām ir priekšrocības un ierobežojumi (7) (17).

Ir vajadzīgs laboratorijas standartaprīkojums, un jo īpaši šāds aprīkojums:

— analīzes iekārtas, tādas kā GŠH, *HPLC*, TLC aprīkojums, iekļaujot attiecīgās atklāšanas sistēmas radioaktīvi marķētu un nemarķētu vielu analīzei vai apgrieztajai izotopu atšķaidīš metodei,

— aparāti identifikācijas nolūkiem (piemēram, MS, GC-MS, *HPLC*-MS, KMR utt.),

— šķidruma scintilāciju skaitītājs,

— oksidēšanas iekārta radioaktīvā materiāla sadedzināšanai,

— centrifūga,

— ekstrahēšanas aparāts (piemēram, centrifūgas mēģenes aukstajai ekstrahēšanai un Soksleta aparāts nepārtrauktai ekstrahēšanai ar atteci),

— aprīkojums šķīdumu un ekstraktu koncentrēšanai (piemēram, rotācijas iztvaicētājs),

— ūdens vanna,

— mehāniskais maisītājs (piemēram, mīcītājs, rotācijas maisītājs).

▼B

Izmantojamie ķīmiskie reaģenti, piemēram, ir:

— NaOH, analītiski tīrs, 2 mol· dm^{-3}, vai cita piemērota bāze (piemēram, KOH, etanolamīns),

— H_2SO_4, analītiski tīrs, 0,05 mol· dm^{-3},

— etilēnglikols, analītiski tīrs,

— cieti absorbcijas materiāli, tādi kā natronkaļķi un poliuretāna aizbāžņi,

— organiskie šķīdinātāji, analītiski tīri, tādi kā acetons, metanols utt.,

— scintilācijas šķidrums.

1.8.2. **Testējamās vielas pielietošana**

Testējamo vielu pielietošanai un sadalīšanai augsnē var izšķīdināt ūdenī (dejonizētā vai destilētā) vai vajadzības gadījumā niecīgos daudzumos acetonā vai citos organiskajos šķīdinātājos (6), kuros testējamā viela ir pietiekami šķīstoša un stabila. Tomēr izraudzītā šķīdinātāja daudzums nedrīkst ievērojami ietekmēt augsnes mikrobu aktivitāti (skatīt 1.5. un 1.9.2.–1.9.3. punktu). Ir jāizvairās lietot šķīdinātājus, kas kavē mikrobu aktivitāti, piemēram, hloroformu, dihlormetānu un citus halogenētus šķīdinātājus.

Testējamo vielu var arī pievienot kā cietu vielu, piemēram, sajauktu ar kvarca smiltīm (6) vai testa augsnes, kas ir izžāvēta gaisā, sausa un sterilizēta, nelielā apakšparaugā. Ja testējamo vielu pievieno, izmantojot šķīdinātāju, ir jāļauj šķīdinātājam iztvaikot, pirms apakšparaugu ar piejaukumu pievieno oriģinālajam nesterilajam augsnes paraugam.

Parastajām ķīmiskajām vielām, kuru galvenais iekļūšanas veids augsnē ir caur notekūdeņu dūņām/pielietošanu lauksaimniecībā, testējamā viela ir vispirms jāpievieno dūņām, ko pēc tam ievada augsnes paraugā (skatīt 1.9.2. un 1.9.3. punktu).

Izmantot preparātus parasti nav ieteicams. Tomēr, piemēram, slikti šķīstošām testējamām vielām preparātu izmantošana var būt piemērota alternatīva.

1.8.3. **Augsnes**

1.8.3.1. *Augšņu atlase*

Lai noteiktu transformācijas ceļu, var lietot reprezentatīvu augsni; ir ieteicams smilšains smilšmāls vai sanešu smilšmāls, vai smilšmāls, vai smilšmālaina smilts (saskaņā ar FAO un USDA klasifikāciju (18)) ar pH 5,5–8,0, organiskā oglekļa saturu 0,5–2,5 % un mikrobu biomasu vismaz 1 % no kopējā organiskā oglekļa (10).

Transformācijas ātruma pētījumos jāizmanto vismaz trīs papildu augsnes, kas pārstāv attiecīgo augšņu diapazonu. Augsnēm jāatšķiras pēc oglekļa satura, pH, mālu satura un mikrobu biomasas (10).

▼B

Visas augsnes jāraksturo vismaz attiecībā uz struktūru (% smilšu, % sanešu, % mālu) (saskaņā ar FAO un USDA klasifikāciju (18)), pH, katjonu apmaiņas spēju, organisko oglekli, bēruma blīvumu, ūdens aiztures īpašībām un mikrobu biomasu (tikai aerobiem pētījumiem). Rezultātu interpretēšanā var būt noderīga papildu informācija par augsnes īpašībām. Augsnes īpašību noteikšanai var izmantot literatūras sarakstā (19) (20) (21) (22) (23) ieteiktās metodes. Mikrobu masa ir jānosaka, izmantojot substrāta inducētās elpošanas (SIR) metodi (25) (26) vai alternatīvas metodes (20).

1.8.3.2. *Augšņu vākšana, apstrāde un glabāšana*

Ir jābūt pieejamai sīkai informācijai par tās vietas vēsturi, no kuras savākta testa augsne. Dati iekļauj precīzu atrašanās vietu, zemsedzi, datus par apstrādi ar ķīmiskām vielām, apstrādi ar organiskajiem un neorganiskajiem mēslošanas līdzekļiem, bioloģisko materiālu piedevām vai citiem piesārņojumiem. Ja augsnes iepriekšējos četros gados ir apstrādātas ar testējamo vielu vai tās struktūras analogiem, tās nav jāizmanto transformācijas pētījumos (10) (15).

Augsnei jābūt tikko savāktai no lauka (no A horizonta vai no augsnes augšējā 20 cm biezā slāņa) ar augsnes ūdens saturu, kas atvieglo sijāšanu. Augsnēm, kas nav rīsa lauku augsnes, no paraugu ņemšanas jāizvairās ilgu (> 30 dienu) sausuma, sasaluma vai pārplūšanas periodu laikā vai tūlīt pēc tiem (14). Paraugi ir jāpārved tādā veidā, kas iespējami samazina augsnes ūdens satura izmaiņas, un, cik iespējams, jātur tumsā, brīvi piekļūstot gaisam. Šajā nolūkā parasti ir piemērots vaļīgi aizsiets polietilēna maiss.

Augsne jāapstrādā iespējami drīz pēc paraugu ņemšanas. Veģetācija, lielāka augsnes fauna un akmeņi ir jāizņem, pirms augsni izsijā caur 2 mm sietu, kas atdala mazus akmeņus, faunu un augu atliekas. Jāizvairās no augsnes intensīvas žāvēšanas un drupināšanas pirms sijāšanas (15).

Ja ziemā paraugu ņemšana laukā ir apgrūtināta (augsne sasalusi vai pārklāta ar sniega slāni), to var ņemt no augsnes krājuma, ko glabā siltumnīcā zem zemsedzes (piemēram, zāles vai zāles un āboliņa maisījumiem). Pētījumiem ar tikko no lauka savāktu augsni noteikti ir priekšroka, bet, ja savāktā un apstrādātā augsne ir jāglabā pirms pētījuma sākšanas, glabāšanas apstākļiem jābūt atbilstošiem un tikai uz ierobežotu laiku (4 ± 2 °C temperatūrā maksimāli uz trim mēnešiem), lai saglabātos mikrobu aktivitāte. Sīki izstrādātas instrukcijas par biotransformācijas eksperimentos izmantojamo augšņu vākšanu, apstrādi un glabāšanu ir atrodamas literatūras sarakstā (8) (10) (15) (26) (27).

▼B

Pirms apstrādāto augsni izmanto šajā testā, tai izdara priekšinkubāciju, lai izdiedzētu un atdalītu sēklas un lai atjaunotu mikrobu metabolisma līdzsvaru pēc izmaiņām no paraugu ņemšanas vai glabāšanas apstākļiem uz inkubācijas apstākļiem. Parasti ir piemērots 2 līdz 28 dienu priekšinkubācijas periods aptuvenos faktiskā testa temperatūras un mitruma apstākļos. Glabāšanas un priekšinkubācijas laikam kopā nav jāpārsniedz trīs mēneši.

1.9. TESTA NORISE

1.9.1. **Testa apstākļi**

1.9.1.1. *Testa temperatūra*

Visā testa laikā augsnes ir jāinkubē tumsā, nemainīgā temperatūrā, kas ir reprezentatīva klimata apstākļiem, kuros notiks vielas izmantošana vai izlaišana. Ieteicama 20 ± 2 °C temperatūra visām testējamām vielām, kas var nokļūt augsnē mērenā klimatā. Temperatūra ir jāpārrauga.

Attiecībā uz ķīmiskām vielām, ko pielieto vai izlaiž aukstākā klimatā (piemēram, ziemeļu valstīs, rudens/ziemas periodos), ir jāinkubē papildu augsnes paraugi, bet zemākā temperatūrā (piemēram, 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Mitruma saturs*

Transformācijas testiem aerobos apstākļos augsnes mitruma saturs jākoriģē un jāuztur pie pF no 2,0 līdz 2,5 (3). Augsnes mitruma saturu izsaka kā ūdens masu uz sausas augsnes masu, un tas ir regulāri jākontrolē (piemēram, divu nedēļu starplaikos), sverot inkubācijas kolbas un kompensējot ūdens zudumus ar ūdens (vēlams, sterili filtrēta krāna ūdens) pievienošanu. Jārūpējas, lai novērstu vai iespējami samazinātu testējamās vielas un/vai transformācijas produktu zudumus iztvaikošanas un/vai fotonoārdīšanās (ja tā notiek) veidā mitruma papildināšanas laikā.

Transformācijas testiem anaerobos un rīsa lauku apstākļos augsne ir piesātināta ar ūdeni appludinot.

1.9.1.3. *Aerobas inkubācijas apstākļi*

Caurplūdes sistēmās aerobos apstākļus uztur, ar pārtraukumiem appludinot vai nepārtraukti vēdinot ar mitrinātu gaisu. Biometra kolbās gaisa apmaiņu uztur ar difūziju.

1.9.1.4. *Sterili aerobi apstākļi*

Lai iegūtu informāciju par testējamās vielas abiotiskās transformācijas nozīmīgumu, augsnes paraugus var sterilizēt (sterilizācijas metodes skatīt (16) un (29)), apstrādāt ar sterilu testējamo vielu (piemēram, pievienot šķīdumu caur sterilu filtru) un aerēt ar mitrinātu sterilu gaisu, kā aprakstīts 1.9.1.3. punktā. Rīsa lauku augsne un ūdens jāsterilizē un inkubācija jāizdara, kā aprakstīts 1.9.1.6. punktā.

▼B

1.9.1.5. *Anaerobas inkubācijas apstākļi*

Lai izveidotu un uzturētu anaerobus apstākļus, ar testējamo vielu apstrādātu un 30 dienas vai vienu pussabrukšanas periodu, vai DT_{50} (atkarībā no tā, kurš ir īsāks) aerobos apstākļos inkubētu augsni pēc tam pārklāj ar ūdeni (1–3 cm biezu ūdens slāni) un inkubācijas sistēmu applūdina ar inertu gāzi (piemēram, slāpekli vai argonu). Testa sistēmā jāvar izdarīt mērījumus, tādus kā pH, skābekļa koncentrācija un redokspotenciāls, un jāiekļauj gaistošo produktu uztveršanas ierīces. Biometra veida sistēmai jābūt noslēgtai, lai izvairītos no gaisa iekļūšanas difundējot.

1.9.1.6. *Rīsa lauka inkubācijas apstākļi*

Lai pētītu transformāciju rīsu lauku augsnēs, augsni applūdina ar apmēram 1–5 cm biezu ūdens slāni un testējamo vielu pielieto ūdens fāzei (9). Ieteicamais augsnes dziļums ir vismaz 5 cm. Sistēmu vēdina ar gaisu tāpat kā aerobos apstākļos. Jāpārrauga un jāreģistrē ūdens slāņa pH, skābekļa koncentrācija un redokspotenciāls. Pirms transformācijas pētījumu uzsākšanas ir nepieciešams vismaz divas nedēļas ilgs pirmsinkubācijas laika posms (skatīt 1.8.3.2. punktu).

1.9.1.7. *Testa ilgums*

Ātruma un noārdīšanās ceļa pētījumiem parasti nav jāpārsniedz 120 dienas (3) (6) (8), jo pēc tam mākslīgā laboratorijas sistēmā, kas izolēta no dabiskās papildināšanās, ir sagaidāma augsnes mikrobu aktivitātes samazināšanās. Ja ir jāraksturo testējamās vielas samazinājums un galveno transformācijas produktu veidošanās un samazinājums, pētījumu var turpināt ilgākā laika posmā (piemēram, 6 vai 12 mēnešus) (8). Ilgāki inkubācijas periodi ir jāpamato pārskatā par testu, un tiem jābūt kopā ar biomasas mērījumiem minēto periodu laikā un to beigās.

1.9.2. **Testa norise**

Aptuveni 50 līdz 200 g augsnes (pamatojoties uz sausu svaru) ievieto katrā inkubācijas kolbā (skatīt 3. papildinājuma 1. un 2. attēlu) un augsni apstrādā ar testējamo vielu, izmantojot vienu no 1.8.2. punktā aprakstītajām metodēm. Ja testējamās vielas pielietošanai izmanto organiskos šķīdinātājus, tie ir jāaizvada no augsnes iztvaicējot. Pēc tam augsni rūpīgi sajauc ar lāpstiņu un/vai kratot kolbu. Ja pētījumu veic rīsa lauka apstākļos, augsne un ūdens pēc testējamās vielas pielietošanas ir rūpīgi jāsajauc. Apstrādātās augsnes mazi alikvoti (piemēram, 1 g) ir jāanalizē attiecībā uz testējamo vielu, lai pārbaudītu tās vienmērīgu sadalījumu. Alternatīvu metodi skatīt turpmāk.

▼B

Apstrādes devai jāatbilst lietošanas pamācībās ieteiktajai augstākajai kultūraugu aizsardzības līdzekļa devai un jābūt vienmērīgi iestrādātai atbilstoši dziļumam laukā (piemēram, augsnes augšējā 10 cm biezā slānī [1]). Piemēram, ķīmiskajām vielām, ko bez iestrādāšanas pielieto uz lapām vai augsnes, atbilstošais dziļums izskaitļošanai, cik daudz ķīmiskās vielas ir jāpievieno katrā kolbā, ir 2,5 cm. Augsnē iestrādātām ķīmiskajām vielām atbilstošais dziļums ir lietošanas pamācībās norādītais iestrādāšanas dziļums. Vispārējām ķīmiskajām vielām lietojuma deva jāaplēš, pamatojoties uz visatbilstošāko ievadīšanas veidu; piemēram, ja galvenais ievadīšanas veids augsnē ir caur notekūdeņu dūņām, ķīmiskā viela ir jādozē dūņās koncentrācijā, kas atspoguļo sagaidāmo koncentrāciju dūņās, un augsnei pievienoto dūņu daudzumam jāatspoguļo parastā dūņu slodze uz lauksaimniecības augsnēm. Ja attiecīgā koncentrācija nav pietiekami liela galveno transformācijas produktu identificēšanai, var būt noderīgi inkubēt atsevišķus augsnes paraugus, kas satur lielākas devas, bet ir jāizvairās no pārlieku lielām devām, kas ietekmē augsnes mikrobu funkcijas (skatīt 1.5. un 1.8.2. punktu).

Alternatīvi – ar testējamo vielu var apstrādāt lielāku augsnes partiju (t. i., 1 līdz 2 kg), kas rūpīgi sajaukta piemērotā maisītājā un pēc tam mazās 50 līdz 200 g daļās pārnesta inkubācijas kolbās (piemēram, izmantojot parauga dalītājus). Apstrādātās augsnes partijas mazi alikvoti (piemēram, 1 g) ir jāanalizē attiecībā uz testējamo vielu, lai pārbaudītu tās vienmērīgu sadalījumu. Tādai procedūrai ir priekšroka, jo tā ļauj vienmērīgāk sadalīt testējamo vielu augsnē.

Neapstrādātās augsnes paraugus arī inkubē tādos pašos apstākļos (aerobos) kā paraugus, kas apstrādāti ar testējamo vielu. Minētos paraugus izmanto biomasas mērījumiem pētījuma laikā un tā beigās.

Ja augsnē pielieto organiskajā(-os) šķīdinātājā(-os) izšķīdinātu testējamo vielu, augsnes paraugus, kas apstrādāti ar to pašu šķīdinātāja(-u) daudzumu, inkubē tādos pašos apstākļos (aerobos) kā ar testējamo vielu apstrādātos paraugus. Minētos paraugus izmanto biomasas mērījumiem sākumā, pētījuma laikā un beigās, lai pārbaudītu šķīdinātāja(-u) iedarbību uz mikrobu biomasu.

Kolbas, kas satur apstrādāto augsni, vai nu pievieno 1. attēlā parādītajai caurplūdes sistēmai, vai arī noslēdz ar 2. attēlā parādīto absorbcijas kolonnu (skatīt 3. papildinājumu).

([1]) Sākotnējo koncentrāciju, pamatojoties uz platību, aprēķina, izmantojot šādu vienādojumu:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = sākotnējā koncentrācija augsnē,

A = lietojuma deva [kg· ha^{-1}]; l = augsnes slāņa biezums laukā [m]; d = sausais augsnes bēruma blīvums [kg· m^{-3}].

Aptuveni rēķinot, lietojuma deva 1 kg· ha^{-1} dod augsnes koncentrāciju aptuveni 1 mg· kg^{-1} 10 cm biezā slānī (pieņemot, ka bēruma blīvums ir 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Paraugu ņemšana un mērīšana**

Dublikātu inkubācijas kolbas atbilstošos starplaikos izņem un augsnes paraugus ekstrahē ar piemērotiem dažādas polaritātes šķīdinātājiem un analizē attiecībā uz testējamo vielu un/vai transformācijas produktiem. Labi izplānots pētījums iekļauj pietiekami daudz kolbu tā, lai katrā paraugu ņemšanas reizē izmantotu divas kolbas. Arī absorbcijas šķīdumus vai cietos absorbcijas materiālus izņem dažādos starplaikos (7 dienu starplaikos pirmā mēneša laikā un pēc viena mēneša 17 dienu starplaikos) katra augsnes parauga inkubācijas laikā un beigās un analizē attiecībā uz gaistošajiem produktiem. Bez augsnes parauga, ko ņem tieši pēc pielietošanas (0. dienas paraugs), jāiekļauj vismaz piecu papildu paraugu ņemšanas punkti. Starplaiki jāizvēlas tā, lai varētu izveidot testējamās vielas samazināšanās modeli un transformācijas produktu veidošanās un samazināšanās modeli (piemēram, 0, 1, 3, 7 dienas; 2, 3 nedēļas; 1, 2, 3 mēneši utt.).

Izmantojot ar ^{14}C marķētu testējamo vielu, neekstrahējamo radioaktivitāti kvantitatīvi nosaka sadedzinot un katram paraugu ņemšanas starplaikam aprēķina masas bilanci.

Anaerobās un rīsa lauka inkubācijas gadījumā augsnes un ūdens fāzes analizē kopā attiecībā uz testējamo vielu un transformācijas produktiem vai arī pirms ekstrakcijas un analīzes atdala filtrējot vai centrifugējot.

1.9.4. **Neobligātie testi**

Aerobi, nesterili pētījumi papildu temperatūrās un pie papildu augsnes mitrumiem var būt noderīgi, lai noteiktu temperatūras un augsnes mitruma ietekmi uz testējamās vielas transformācijas ātrumiem un/vai tās transformācijas produktiem augsnē.

Var mēģināt papildus raksturot neekstrahējamo radioaktivitāti, izmantojot, piemēram, superkritiskā šķidruma ekstrakciju.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Testējamās vielas daudzumi, transformācijas produkti, gaistošās vielas (tikai %) un neekstrahējamās vielas jāsniedz kā pielietotās sākuma koncentrācijas % un attiecīgā gadījumā kā $mg \cdot kg^{-1}$ augsnes (pamatojoties uz augsnes sauso svaru) katrā paraugu ņemšanas starplaikā. Masas bilance jāsniedz kā pielietotās sākotnējās koncentrācijas procentuālais daudzums katrā paraugu ņemšanas starplaikā. Testējamās vielas koncentrāciju grafiskais attēlojums attiecībā pret laiku ļauj novērtēt tās transformācijas pussabrukšanas periodu vai DT_{50}. Galvenie transformācijas produkti ir jāidentificē un to koncentrācijas arī jāatliek pret laiku, lai parādītu to veidošanās un samazināšanās ātrumus. Galvenais transformācijas produkts ir jebkurš produkts, kas pārstāv ≥ 10 % no pielietotās devas jebkurā pētījuma laika brīdī.

Uztvertie gaistošie produkti sniedz norādi uz testējamās vielas un tās transformācijas produktu gaistamības potenciālu no augsnes.

▼B

Precīzākas pussabrukšanas perioda vai DT_{50} vērtības un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} vērtības ir jāiegūst, pielietojot atbilstošus kinētiskā modeļa aprēķinus. Pussabrukšanas perioda un DT_{50} vērtības jāreģistrē kopā ar izmantotā modeļa aprakstu, kinētikas kārtu un noteikšanas koeficientu (r^2). Priekšroka ir pirmās kārtas kinētikai, ja vien $r^2 < 0,7$. Attiecīgā gadījumā aprēķini jāpielieto arī galvenajiem transformācijas produktiem. Piemērotu modeļu piemēri ir aprakstīti literatūras sarakstā (31)–(35).

Dažādās temperatūrās izdarītos ātruma pētījumos transformācijas ātrumi eksperimenta temperatūru diapazonā ir jāapraksta kā temperatūras funkcija, izmantojot Arrēniusa sakarību formā:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

kur ln A un B ir regresijas konstantes attiecīgi no koordinātu ass nogriežņa un slīpuma leņķa vislabāk atbilstošajai taisnei, kas izveidota, atliekot ln k pret 1/T, k ir ātruma konstante temperatūrā T un T ir temperatūra Kelvina grādos. Jāpievērš uzmanība ierobežotajam temperatūras diapazonam, kurā Arreniusa sakarība ir derīga, ja transformāciju ietekmē mikrobu darbība.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Kaut arī pētījumu veic mākslīgā laboratorijas sistēmā, rezultāti ļauj novērtēt testējamās vielas transformācijas ātrumu un arī transformācijas produktu veidošanās un samazināšanās ātrumu lauka apstākļos (36) (37).

Testējamās vielas transformācijas ceļu pētījums sniedz informāciju par veidu, kā pielietotās vielas struktūra augsnē mainās ķīmiskās un mikrobu reakcijās.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā par testu jāiekļauj:

Testējamā viela:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula (norādot marķētā(-o) atoma(-u) stāvokli, ja izmanto radioaktīvi marķētu materiālu) un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības (skatīt 1.5. punktu),

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi),

— marķēto ķīmisko vielu radioķīmiskā tīrība un īpatnējā aktivitāte (attiecīgā gadījumā).

Standartvielas:

— transformācijas produktu raksturošanai un/vai identifikācijai izmantoto standartvielu ķīmiskais nosaukums un struktūra.

Testa augsnes:

— sīki dati par vākšanas vietu,

— augsnes paraugu ņemšanas datums un procedūra,

▼B

— augšņu īpašības, piemēram, pH, organiskā oglekļa saturs, struktūra (% smilšu, % sanešu, % mālu) katjonu apmaiņas spēja, bēruma blīvums, ūdens aiztures raksturojums un mikrobu biomasa,

— augsnes glabāšanas ilgums un glabāšanas apstākļi (ja augsne glabāta).

Testa apstākļi:

— pētījuma norises datumi,

— pielietotās testējamās vielas daudzums,

— testējamās vielas pielietošanas metode un izmantotie šķīdinātāji,

— sākotnēji apstrādātās augsnes svars un katrā analīzes starplaikā ņemto paraugu svars,

— izmantotās inkubācijas sistēmas apraksts,

— gaisa plūsmas ātrumi (tikai caurplūdes sistēmām),

— eksperimentālā veidojuma temperatūra,

— augsnes mitruma saturs inkubācijas laikā,

— mikrobu biomasa aerobā pētījuma sākumā, tā laikā un beigās,

— pH, skābekļa koncentrācija un redokspotenciāls anaerobā un rīsa lauka pētījuma sākumā, tā laikā un beigās,

— ekstrahēšanas metode(-es),

— testējamās vielas un galveno transformācijas produktu kvantitatīvās noteikšanas un identifikācijas metodes augsnē un absorbcijas materiālos,

— atkārtojumu skaits un kontroles mēģinājumu skaits.

Rezultāti:

— mikrobu aktivitātes noteikšanas rezultāts,

— izmantoto analīzes metožu atkārtojamība un jutība,

— atgūstamība (% vērtības derīgam pētījumam ir sniegtas 1.7.1. punktā),

— tabulas ar rezultātiem, kas izteikti kā pielietotās sākuma devas % un attiecīgā gadījumā kā $mg.kg^{-1}$ augsnes (pamatojoties uz sausu svaru),

— masas bilance pētījuma laikā un beigās,

— neekstrahējamās (saistītās) radioaktivitātes vai atlieku raksturojums augsnē,

— izdalītās CO_2 un citu gaistošo savienojumu kvantitatīvā noteikšana,

— testējamās vielas un attiecīgā gadījumā galveno transformācijas produktu koncentrācijas grafika attiecība pret laiku,

— testējamās vielas un attiecīgā gadījumā galveno transformācijas produktu pussabrukšanas periods vai DT_{50}, DT_{75} un DT_{90}, iekļaujot ticamības robežas,

▼B

— abiotiskās noārdīšanās ātruma novērtējums sterilos apstākļos,

— testējamās vielas un attiecīgā gadījumā galveno transformācijas produktu transformācijas kinētikas novērtējums,

— ierosinātie transformācijas ceļi attiecīgā gadījumā,

— rezultātu apspriešana un interpretācija,

— izejas dati (t. i., paraugu hromatogrammas, paraugu transformācijas ātrumu aprēķini un transformācijas produktu identifikācijai izmantotie līdzekļi).

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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 III, 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 soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung 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 (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.

(16) Annex V to Directive 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, p. 85–114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, 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) Mückenhausen, 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, p. 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 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, p. 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, p. 59–63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, p. 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, p. 197–200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 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, p. 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., p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 83–122.

▼B

1.PAPILDINĀJUMS

ŪDENS SPRIEGUMS, LAUKA IETILPĪBA (*FC*) UN ŪDENSIETILPĪBA (*WHC*) [1]

Ūdens staba augstums(cm)	pF [a]	bar [b]	Komentāri
10^7	7	10^4	Sausa augsne
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Vīšanas punkts
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]	
10^2	2	0,1	Lauka ietilpības diapazons [d]
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	*WHC* (tuvinājums)
1	0	0,001	Ūdens piesātināta augsne

[a] pF = log no ūdens staba cm.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Atbilst aptuvenam ūdens saturam 10 % smiltī, 35 % mālsmiltī un 45 % mālā.
[d] Lauka ietilpība nav nemainīga, bet atkarībā no augsnes tipa mainās pF no 1,5 un 2,5.

Ūdens spraigumu mēra ūdens staba centimetros vai bāros. Uzsūkšanas spraiguma lielā diapazona dēļ to izsaka vienkārši kā pF vērtību, kas ir līdzvērtīga ūdens staba centimetru logaritmam.

Lauka ietilpību nosaka kā ūdens daudzumu, ko dabiska augsne var saglabāt pretī smaguma spēkam divas dienas pēc ilga lietus perioda vai pēc pietiekamas apūdeņošanas. To nosaka neskartā augsnē *in situ* laukā. Mērīšana tādēļ nav pielietojama skartiem laboratorijas augsnes paraugiem. Lauka ietilpības (*FC*) vērtības, kas noteiktas skartās augsnēs, var uzrādīt lielas sistemātiskas atkāpes.

Ūdensietilpību (*WHC*) nosaka laboratorijā neskartai un skartai augsnei, piesātinot ar ūdeni augsnes kolonnu ar kapilāro pārnesi. Tā ir īpaši noderīga skartām augsnēm, un tā var būt līdz 30 % lielāka par lauka ietilpību (1). Arī eksperimentāli to ir vieglāk noteikt nekā ticamas *FC* vērtības.

Piezīmes

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

2. PAPILDINĀJUMS

AUGSNES MITRUMA SATURS (g ūdens un 100 g sausas augsnes) DAŽĀDIEM AUGŠŅU TIPIEM NO DAŽĀDĀM VALSTĪM

Augsnes tips	Valsts	Mitruma saturs		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Smilts	Vācija	28,7	8,8	3,9
Smilšmālaina smilts	Vācija	50,4	17,9	12,1
Smilšmālaina smilts	Šveice	44,0	35,3	9,2
Sanešu smilšmāls	Šveice	72,8	56,6	28,4
Mālains smilšmāls	Brazīlija	69,7	38,4	27,3
Mālains smilšmāls	Japāna	74,4	57,8	31,4
Smilšains smilšmāls	Japāna	82,4	59,2	36,0
Sanešu smilšmāls	ASV	47,2	33,2	18,8
Smilšains smilšmāls	ASV	40,4	25,2	13,3

([1]) Ūdensietilpība.

▼B

3. PAPILDINĀJUMS

1. attēls

Caurplūdes aparāta piemērs ķīmisko vielu transformācijas augsnē pētījumiem ([1]) ([2])

1: adatas ventilis

2: gāzu skalotne, kurā ir ūdens

3: ultramembrāna (tikai sterilos apstākļos), poru lielums 0,2 μm

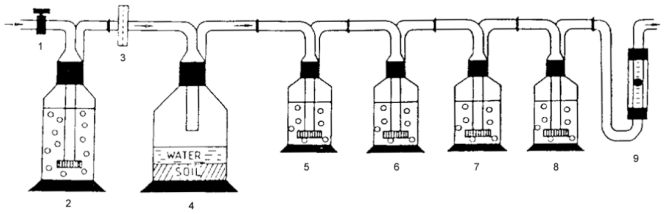
4: augsnes metabolisma pudele (ar stāvošu ūdeni tikai anaerobos un rīsa lauka apstākļos)

5: uztvērējs ar etilēnglikolu gaistošiem organiskiem savienojumiem

6: uztvērējs ar sērskābi sārmainiem gaistošiem savienojumiem

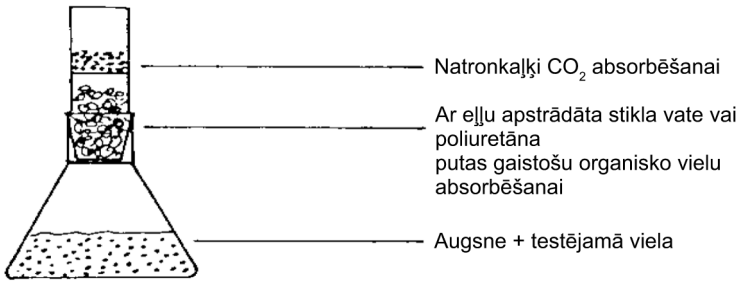
7, 8: uztvērējs ar nātrija hidroksīdu CO_2 un citiem skābiem gaistošiem savienojumiem

9: plūsmas mērītājs.



2. attēls

Biometra tipa kolbas piemērs ķīmisko vielu transformācijas pētījumiem augsnē ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 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, p. 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, p. 141–146.

▼B

C.24. AEROBĀ UN ANAEROBĀ TRANSFORMĀCIJA ŪDENS NOSĒDUMU SISTĒMĀS

1. METODE

Šī testa metode ir ESAO 308 (2002) vadlīnijā noteiktās metodes kopija.

1.1. IEVADS

Ķīmiskās vielas var iekļūt seklos vai dziļos virsmas ūdeņos ar tādiem ievadīšanas veidiem kā tiešā pielietošana, aerosolu pārvietošanās, noplūde, nosusināšana, atkritumu apglabāšana, rūpniecības, mājsaimniecības vai lauksaimniecības notekūdeņi un izgulsnēšanās no atmosfēras. Šī testa metode apraksta laboratorijas metodi organisko ķīmisko vielu aerobās un anaerobās transformācijas novērtēšanai ūdens nosēdumu sistēmās. Tā pamatojas uz esošajām pamatnostādnēm (1) (2) (3) (4) (5) (6). ESAO seminārā par augsnes un nosēdumu atlasi, kas 1995. gadā notika Beldžiratē, Itālijā (7), vienojās jo īpaši par šajā testā izmantojamo augšņu skaitu un tipu. Seminārs arī sniedza ieteikumus attiecībā uz nosēdumu paraugu vākšanu, apstrādi un glabāšanu, pamatojoties uz ISO pamatnostādnēm (8). Tādi pētījumi ir vajadzīgi par ķīmiskajām vielām, ko tieši pielieto ūdenī vai kas varētu nokļūt ūdens vidē iepriekš aprakstītajā veidā.

Dabīgo ūdens nosēdumu sistēmas augšējā ūdens fāzē bieži ir aerobas. Nosēdumu virsmas slānis var būt aerobs vai anaerobs, bet dziļākie nosēdumi parasti ir anaerobi. Lai ietvertu visas minētās iespējas, šajā dokumentā ir aprakstīti gan aerobi, gan anaerobi testi. Aerobais tests simulē aerobu ūdens kolonnu virs aeroba nosēdumu slāņa, zem kura ir anaerobs gradients. Anaerobs tests simulē pilnīgi anaerobu ūdens–-nosēdumu sistēmu. Ja apstākļi rāda, ka ir ievērojami jāatkāpjas no šiem ieteikumiem, piemēram, izmantojot neskartas nosēdumu serdes vai nosēdumus, uz ko varētu būt iedarbojusies testējamā viela, attiecīgajam nolūkam ir pieejamas citas metodes (9).

1.2. DEFINĪCIJAS

Visos gadījumos jālieto starptautiskās mērvienību sistēmas (SI) vienības.

Testējamā viela: jebkura viela, vai nu izejas savienojums, vai arī attiecīgie transformācijas produkti.

Transformācijas produkti: visas vielas, kas rodas testējamās vielas biotiskās vai abiotiskās transformācijas reakcijās, iekļaujot CO_2 un saistītās nogulsnes.

Saistītās nogulsnes: "saistītās nogulsnes" ir vielas augsnē, augos vai dzīvniekos, kuras ir noturīgas matricā izejas savienojuma vai tā metabolītu veidā pēc ekstrakcijas. Ekstrakcijas metode nedrīkst būtiski mainīt pašus savienojumus vai matricas struktūru. Saistības veidu var noskaidrot daļēji ar matricu mainošām ekstrakcijas metodēm un sarežģītām analīzes metodēm. Līdz šim, piemēram, šādā veidā ir identificētas kovalentās, jonu un sorbcijas saites, kā arī ieslēgumi. Parasti saistīto nogulšņu veidošanās ievērojami samazina bioloģisko pieejamību un bioloģiski pieejamo daudzumu (10) (Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība – modificēts 1984. gadā (11)).

▼B

Aerobā transformācija: (oksidējošā) – reakcijas, kas notiek molekulārā skābekļa klātbūtnē (12).

Anaerobā transformācija: (reducējošā) – reakcijas, kas notiek, izslēdzot molekulārā skābekļa klātbūtni (12).

Dabīgie ūdeņi: virsmas ūdeņi, iegūti no dīķiem, upēm, strautiem utt.

Nosēdumi: neorganisku un organisku ķīmisko sastāvdaļu maisījums, pēdējās minētās satur savienojumus ar lielu oglekļa un slāpekļa saturu un lielu molekulsvaru. Tos izgulsnē dabīgie ūdeņi, un tie veido saskari ar attiecīgo ūdeni.

Mineralizācija: pilnīga organisko savienojumu noārdīšanās līdz CO_2 un H_2O aerobos apstākļos un līdz CH_4, CO_2 un H_2O anaerobos apstākļos. Šīs testa metodes kontekstā, ja izmanto radioaktīvi marķētu savienojumu, mineralizācija nozīmē intensīvu molekulas noārdīšanos, kuras laikā marķētā oglekļa atomi kvantitatīvi oksidējas vai reducējas, izdalot attiecīgu daudzumu $^{14}CO_2$ vai $^{14}CH_4$.

Pussabrukšanas periods, $t_{0,5}$: laiks, kas vajadzīgs, lai transformētu 50 % testējamās vielas, ja transformāciju var aprakstīt pirmās kārtas kinētika; tas nav atkarīgs no sākotnējās koncentrācijas.

DT_{50} (izzušanas laiks 50): laiks, kurā testējamās vielas sākotnējā koncentrācija samazinās par 50 %.

DT_{75} (izzušanas laiks 75): laiks, kurā testējamās vielas sākotnējā koncentrācija samazinās par 75 %.

DT_{90} (izzušanas laiks 90): laiks, kurā testējamās vielas sākotnējā koncentrācija samazinās par 90 %.

1.3. STANDARTVIELAS

Standartvielas jāizmanto transformācijas produktu identifikācijai un kvantitatīvai noteikšanai ar spektroskopijas un hromatogrāfijas metodēm.

1.4. INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Transformācijas ātruma mērīšanai var izmantot nemarķētas vai ar izotopiem marķētas vielas, kaut arī priekšroka ir marķētam materiālam. Marķēts materiāls ir vajadzīgs, lai pētītu transformācijas ceļu un noteiktu masas bilanci. Ir ieteicama marķēšana ar ^{14}C, bet noderīga var būt arī citu izotopu, tādu kā ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, izmantošana. Cik iespējams, marķējums jānovieto molekulas stabilākajā(-ās) daļā(-ās). Testējamās vielas ķīmiskajai un/vai radioķīmiskajai tīrībai jābūt vismaz 95 %.

Pirms testa izdarīšanas ir vajadzīga šāda informācija par testējamo vielu:

a) šķīdība ūdenī (A.6. metode);

b) šķīdība organiskajos šķīdinātājos;

c) tvaika spiediens (A.4. metode) un Henrija likuma konstante;

▼B

d) sadalījuma koeficients sistēmā n-oktanols/ūdens (A.8. metode);

e) adsorbcijas koeficients (attiecīgā gadījumā Kd, Kf vai Koc) (C.18. metode);

f) hidrolīze (C.7. metode);

g) disociācijas konstante (pKa) (ESAO 112. vadlīnija) (13);

h) testējamās vielas ķīmiskā struktūra un attiecīgā gadījumā marķētā(-o) izotopa(-u) vieta(-as).

Piezīme: ir jāreģistrē temperatūra, kādā minētie mērījumi izdarīti.

Cita noderīga informācija var iekļaut datus par testējamās vielas toksicitāti mikroorganismiem, datus par vieglu un/vai potenciālu bioloģisko noārdīšanos un aerobu un anaerobu transformāciju augsnē.

Jābūt pieejamām analīzes metodēm (iekļaujot ekstrakciju un attīrīšanas metodes) testējamās vielas un tās transformācijas produktu kvantitatīvai noteikšanai un identifikācijai ūdenī un nosēdumos (skatīt 1.7.2. punktu).

1.5. TESTA METODES PRINCIPS

Šajā testā aprakstītā metode izmanto aerobu un anaerobu ūdens nosēdumu sistēmu (skatīt 1. papildinājumu), kas ļauj:

— mērīt testējamās vielas transformācijas ātrumu ūdens–nosēdumu sistēmā,

— mērīt testējamās vielas transformācijas ātrumu nosēdumos,

— mērīt testējamās vielas un/vai tās transformācijas produktu mineralizācijas ātrumu (ja izmanto ar ^{14}C marķētu testējamo vielu),

— identificēt un kvantitatīvi noteikt transformācijas produktus ūdens un nosēdumu fāzē, iekļaujot masas bilanci (ja izmanto ar ^{14}C marķētu testējamo vielu),

— mērīt testējamās vielas un tās transformācijas produktu sadalījumu starp abām fāzēm inkubācijas perioda laikā tumsā (lai izvairītos, piemēram, no aļģu ziedēšanas) nemainīgā temperatūrā. Ja dati atļauj, nosaka pussabrukšanas periodus, DT_{50}, DT_{75} un DT_{90} vērtības, bet tās nedrīkst ekstrapolēt tālu aiz eksperimenta laika posma (skatīt 1.2. punktu).

Vismaz divi nosēdumi un ar tiem saistītie ūdeņi ir vajadzīgi attiecīgi aerobajam un anaerobajam pētījumam (7). Tomēr var būt gadījumi, kad jāizmanto vairāk par diviem ūdens nosēdumiem, piemēram, ķīmiskai vielai, kas var būt klāt saldūdens un/vai jūras vidē.

▼B

1.6. TESTA DERĪGUMS

Metode parasti ir derīga ķīmiskajām vielām (nemarķētām vai radioaktīvi marķētām), kurām ir pieejama pietiekami precīza un jutīga analīzes metode. Tā ir derīga nedaudz gaistošiem, negaistošiem, ūdenī šķīstošiem vai ūdenī slikti šķīstošiem savienojumiem. Tests nav jāpielieto ķīmiskajām vielām, kas ir ļoti gaistošas attiecībā uz ūdeni (piemēram, fumigantiem, organiskajiem šķīdinātājiem) un tādēļ šā testa eksperimenta apstākļos nav saglabājamas ūdenī un/vai nosēdumos.

Metode līdz šim ir pielietota ķīmisko vielu transformācijas pētījumiem saldūdeņos un nosēdumos, bet principā to var pielietot arī grīvas/jūras sistēmām. Tā nav piemērota, lai simulētu apstākļus tekošā ūdenī (piemēram, upēs) vai atklātā jūrā.

1.7. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.7.1. **Atgūstamība**

Vismaz ūdens un nosēdumu paraugu dublikātu ekstrahēšana un analīze tieši pēc testējamās vielas pievienošanas dod pirmo norādi par analīzes metodes atkārtojamību un pielietojamās procedūras vienādību testējamai vielai. Atgūstamību eksperimentu vēlākiem posmiem iegūst no attiecīgajām masas bilancēm (ja izmanto marķētu materiālu). Atgūstamībai jābūt diapazonā no 90 % līdz 110 % marķētām ķīmiskām vielām (6) un no 70 % līdz 110 % nemarķētām ķīmiskām vielām.

1.7.2. **Analīzes metodes atkārtojamība un jutība**

Analīzes metodes atkārtojamību (izņemot sākotnējās ekstrahēšanas efektivitāti) testējamās vielas un transformācijas produktu kvantitatīvā noteikšanā var pārbaudīt ar transformācijas produktu veidošanai pietiekami ilgi inkubēta viena un tā paša ūdens vai nosēdumu parauga ekstrakta dublikātu analīzēm.

Analītiskās metodes kvalitatīvās noteikšanas robežai (KNR) attiecībā uz testējamo vielu un transformācijas produktiem jābūt vismaz 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ ūdenī vai nosēdumos (kā testējamai vielai) vai 1 % no testa sistēmai pielietotās devas, atkarībā no tā, kurš lielums ir mazāks. Ir jānorāda arī kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*).

1.7.3. **Transformācijas datu precizitāte**

Testējamās vielas koncentrācijas kā laika funkcijas regresijas analīze sniedz attiecīgu informāciju par transformācijas līknes precizitāti un ļauj aprēķināt pussabrukšanas perioda ticamības robežas (pseido pirmās kārtas kinētikas gadījumā) vai DT_{50} vērtības un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} vērtības.

1.8. METODES APRAKSTS

1.8.1. **Testa sistēma un aparatūra**

Pētījums jāizdara stikla tvertnēs (piemēram, pudelēs, centrifūgas stobriņos), ja vien iepriekšējā informācija (tāda kā sadalījuma koeficients sistēmā n-oktanols-ūdens, sorbcijas dati utt.) nenorāda, ka testējamā viela var pielipt stiklam, tādā gadījumā var apsvērt alternatīva materiāla (tāda kā teflons) izmantošana. Ja ir zināms, ka testējamā viela pielīp stiklam, var būt iespējams šo problēmu samazināt, izmantojot vienu no šādām metodēm:

▼B

— noteikt uz stikla sorbēto testējamās vielas un transformācijas produktu masu,

— nodrošināt visu stikla priekšmetu mazgāšanu ar šķīdinātāju testa beigās,

— izmantot preparātus (skatīt arī 1.9.2. punktu),

— testējamās vielas pievienošanai sistēmā izmantot palielinātu daudzumu palīgšķīdinātāja; ja izmanto palīgšķīdinātāju, tam jābūt tādam, kas neizraisa testējamās vielas solvolīzi.

Parasto testa aparātu piemēri, t. i., gāzes plūsmas un biometra tipa sistēmas, attiecīgi ir parādīti 2. un 3. papildinājumā (14). Citas noderīgas inkubācijas sistēmas ir aprakstītas (15). Eksperimentālā aparāta konstrukcijai ir jāļauj apmainīties gaisam vai slāpeklim un uztvert gaistošos produktus. Aparāta izmēriem jābūt tādiem, lai tie atbilstu testa prasībām (skatīt 1.9.1. punktu). Vēdināšanu var nodrošināt, lēni burbuļojot vai laižot pāri ūdens virsmai gaisu vai slāpekli. Pēdējā minētā gadījumā, lai būtu labāks skābekļa vai slāpekļa sadalījums, var ieteikt no augšas lēni maisīt ūdeni. Nav jāizmanto CO_2 nesaturošs gaiss, jo tas var izraisīt ūdens pH palielinājumu. Katrā gadījumā nosēdumu traucēšana ir nevēlama un no tās iespējami jāizvairās. Nedaudz gaistošas ķīmiskās vielas ir jātestē biometra tipa sistēmā, lēni maisot ūdens virsmu. Var izmantot arī noslēgtas tvertnes, kuru brīvajā telpā ir atmosfēras gaiss vai slāpeklis un iekšējie stobriņi gaistošo produktu uztveršanai (16). Aerobā testā ir regulāri jāapmaina brīvās telpas gāze, lai kompensētu biomasas patērēto skābekli.

Piemēroti uztvērēji gaistošo transformācijas produktu savākšanai iekļauj 1 mol· dm^{-3} kālija hidroksīda vai nātrija hidroksīda šķīdumus oglekļa dioksīdam un etilēnglikolu, etanolamīnu vai 2 % parafīnu ksilolā organiskajiem savienojumiem, bet ar to nav ierobežoti. Anaerobos apstākļos radušās gaistošās vielas, tādas kā metāns, var savākt, piemēram, ar molekulārajiem sietiem. Tādas vielas var sadedzināt, piemēram, līdz CO_2, laižot gāzi 900 ^{o}C temperatūrā caur kvarca cauruli, kas pildīta ar CuO, un uztverot radušos CO_2 absorberā ar sārmu (17).

Testējamās vielas un transformācijas produktu ķīmiskajai analīzei ir vajadzīgas laboratorijas iekārtas (piemēram, gāzu–šķidruma hromatogrāfija (GŠH), augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija (*HPLC*), plānslāņa hromatogrāfija (TLC), masspektrosmetrija (MS), šķidruma hromatogrāfija–masspektrometrija (LC–MS), kodolmagnētiskā rezonanse (KMR) utt.), attiecīgā gadījumā iekļaujot atklāšanas sistēmas radioaktīvi marķētām vai nemarķētām ķīmiskām vielām. Ja izmanto radioaktīvi marķētu materiālu, vajadzīgs ir arī šķidruma scintilāciju skaitītājs un sadegšanas oksidēšanas iekārta (nosēdumu paraugu sadedzināšanai pirms radioaktivitātes analīzes).

Attiecīgā gadījumā ir vajadzīgs cits standarta laboratorijas aprīkojums fizikāli ķīmiskajām un bioloģiskajām noteikšanām (skatīt 1.8.2.2. punkta 1. tabulu), stikla priekšmeti, ķīmiskās vielas un reaģenti.

▼B

1.8.2. **Ūdens nosēdumu atlase un skaits**

Paraugu ņemšanas vietas izraugās saskaņā ar testa nolūku konkrētajā situācijā. Izraugoties paraugu ņemšanas vietas, jāņem vērā iespējamie agrākie lauksaimniecības, rūpniecības un mājsaimniecības ieguldījumi ieplūdes vietā un augstāk pa straumi. Nosēdumi nav jāizmanto, ja tie ar testējamo vielu vai tās struktūras analogiem ir bijuši piesārņoti iepriekšējo četru gadu laikā.

1.8.2.1. Nosēdumu atlase

Aerobiem pētījumiem parasti izmanto divus nosēdumus (7). Abiem atlasītajiem nosēdumiem jāatšķiras attiecībā uz organiskā oglekļa saturu un struktūru. Vienam no nosēdumiem jābūt ar lielu organiskā oglekļa saturu (2,5–7,5 %) un smalku struktūru, otram jābūt ar mazu organiskā oglekļa saturu (0,5–2,5 %) un rupju struktūru. Organiskā oglekļa saturu atšķirībai parasti jābūt vismaz 2 %. "Smalka struktūra" ir noteikta kā (mālu + sanesu) saturs > 50 % un "rupja struktūra" ir noteikta kā (mālu + sanesu) saturs < 50 %. Abu nosēdumu (mālu + sanesu) satura atšķirībai parasti jābūt vismaz 20 %. Ja ķīmiskā viela var nokļūt arī jūras ūdenī, vismaz vienai ūdens–nosēdumu sistēmai jābūt jūras izcelsmes.

Stingri anaerobā pētījumā divi nosēdumi (iekļaujot ar tiem saistītos ūdeņus) ir jāņem no virsmas ūdeņu anaerobajām zonām (7). Ar nosēdumu un ūdens fāzēm jārīkojas un tās jāpārved uzmanīgi, izslēdzot skābekļa piekļuvi.

Nosēdumu atlasē var būt svarīgi citi rādītāji, un tie jāapsver katrā atsevišķā gadījumā. Piemēram, nosēdumu pH diapazons ir svarīgs, testējot ķīmiskās vielas, kuru transformācija un/vai sorbcija var būt atkarīga no pH. Sorbcijas atkarība no pH var atspoguļoties testējamās vielas pK_a.

1.8.2.2. Ūdens–nosēdumu paraugu raksturošana

Galvenie rādītāji, kas jāmēra un jāreģistrē (norādot izmantoto metodi) par ūdeni un nosēdumiem, un testa posms, kurā attiecīgie rādītāji ir jānosaka, ir apkopoti turpmākajā tabulā. Informācijai – attiecīgo rādītāju noteikšanas metodes ir iekļautas literatūras sarakstā (18) (19) (20) (21).

Turklāt katrā atsevišķā gadījumā var būt jāmēra un jāreģistrē citi rādītāji (piemēram, saldūdenim – daļiņas, sārmainība, cietība, vadītspēja, NO_3/PO_4 (attiecība un individuālās vērtības); nosēdumiem – katjonu apmaiņas spēja, ūdensietilpība, karbonāts, kopējais slāpeklis un fosfors; jūras sistēmām – sāļums). Arī nitrāta, sulfāta, bioloģiski pieejamās dzelzs un, iespējams, citu elektronakceptoru analīze nosēdumos un ūdenī var būt noderīga, novērtējot redoksapstākļus, jo īpaši saistībā ar anaerobo transformāciju.

▼B

Rādītāju mērīšana ūdens–nosēdumu paraugu raksturošanai (7) (22) (23)

Parametrs	Testa procedūras posms					
	paraugu ņemšana laukā	pēcapstrāde	aklimatizācijas sākums	testa sākums	testa laikā	testa beigas
Ūdens						
Izcelsme/avots	x					
Temperatūra	x					
pH	x		x	x	x	x
Kopējais organiskais ogleklis (*TOC*)			x	x		x
O_2 koncentrācija (**)	x		x	x	x	x
Redokspotenciāls (**)			x	x	x	x
Nosēdumi						
Izcelsme/avots	x					
Slāņa dziļums	x					
pH		x	x	x	x	x
Daļiņu lieluma sadalījums		x				
Kopējais organiskais ogleklis (*TOC*)		x	x	x		x
Mikrobu biomasa (*)		x		x		x
Redokspotenciāls (**)	Novērojumi (krāsa/smarža)		x	x	x	x

(*) Mikrobu elpošanas ātruma metode (26), fumigācijas metode (27) vai dzīvotspējīgo mikroorganismu (piemēram, baktēriju, aktinomicešu, sēnīšu un koloniju kopā) skaita novērtējums aerobiem pētījumiem; metānoģenēzes ātrums anaerobiem pētījumiem.

(**) Jaunāko pētījumu rezultāti ir parādījuši, ka skābekļa koncentrāciju ūdenī mērījumiem un ūdens redokspotenciālu mērījumiem nav mehāniska vai iepriekš paredzama vērtība, ciktāl tas attiecas uz mikrobu populāciju augšanu un attīstību virsmas ūdeņos (24) (25). Bioķīmiskā skābekļa patēriņa (BSP, paraugus ņemot laukā, testa sākumā un beigās) un mikro/makro barības vielu Ca, Mg un Mn (testa sākumā un beigās) noteikšana un kopējā N un P mērīšana nosēdumos (paraugus ņemot laukā un testa beigās) var būt labāki rīki aerobās biotransformācijas ātrumu un ceļu interpretācijai un novērtēšanai.

1.8.3. **Savākšana, apstrāde un glabāšana**

1.8.3.1. *Savākšana*

Nosēdumu savākšanā jāizmanto ISO pamatnostādņu projekts par nosēdumu paraugu vākšanu (8). Nosēdumu paraugi jāņem no visa augšējā 5 līdz 10 cm bieza nosēdumu slāņa. Saistītais ūdens jāvāc no tās pašas vietas un tajā pašā laikā kā nosēdumi. Anaerobam pētījumam nosēdumi un saistītais ūdens jāņem un jāpārved, izslēdzot skābekļa piekļuvi (28) (skatīt 1.8.2.1. punktu). Dažas paraugu ņemšanas ierīces ir aprakstītas literatūras sarakstā (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Apstrāde*

Nosēdumus filtrējot atdala no ūdens, un nosēdumus mitrus sijā caur 2 mm sietu, izmantojot no tās pašas vietas ņemtā ūdens pārākumu, ko pēc tam izlej. Pēc tam nosēdumu un ūdens zināmus daudzumus sajauc vēlamajā attiecībā (skatīt 1.9.1. punktu) inkubācijas kolbās un sagatavo aklimatizācijas periodam (skatīt 1.8.4. punktu). Anaerobā pētījumā visi apstrādes posmi jāveic, izslēdzot skābekļa piekļuvi (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Glabāšana*

Ir ļoti ieteicami izmantot svaigi ņemtus nosēdumu un ūdens paraugus, bet, ja glabāt ir nepieciešami, nosēdumi un ūdens ir jāizlaiž caur sietu, kā aprakstīts iepriekš, un jāglabā kopā piesātināti ar ūdeni (6–10 cm biezs ūdens slānis) tumsā, 4 ± 2 °C[4] temperatūrā maksimāli četras nedēļas (7) (8) (23). Aerobos pētījumos izmantojamie paraugi jāglabā ar brīvu gaisa piekļuvi (piemēram, vaļējās tvertnēs), bet anaerobos pētījumos izmantojamie paraugi jāglabā, izslēdzot gaisa piekļuvi. Pārvadāšanas un glabāšanas laikā nosēdumi un ūdens nedrīkst sasalt un izžūt.

1.8.4. **Nosēdumu/ūdens paraugu sagatavošana testam**

Pirms testējamās vielas pievienošanas jābūt aklimatizācijas periodam, kad katrs nosēdumu/ūdens paraugs ir ievietots inkubācijas tvertnē, ko izmantos galvenajā testā, un aklimatizācija jāveic tieši tādos pašos apstākļos kā testa inkubēšana (skatīt 1.9.1. punktu). Aklimatizācijas periods ir laiks, kas vajadzīgs sistēmas pieņemamas stabilitātes sasniegšanai, ko atspoguļo pH, skābekļa koncentrācija ūdenī, nosēdumu un ūdens redokspotenciāls un fāzu makroskopiskā atdalīšanās. Parasti aklimatizācijas periodam jāilgst no vienas līdz divām nedēļām, un tas nedrīkst pārsniegt četras nedēļas. Minētā perioda laikā veikto noteikšanu rezultāti ir jāreģistrē.

1.9. TESTA NORISE

1.9.1. **Testa apstākļi**

Tests jāizdara inkubēšanas aparātā (skatīt 1.8.1. punktu) ar ūdens–nosēdumu tilpuma attiecību no 3:1 līdz 4:1 un ar 2,5 cm (± 0,5 cm) biezu nosēdumu slāni. Minimālais ieteicamais nosēdumu daudzums uz inkubēšanas tvertnes ir 50 g (pamatojoties uz sausu svaru).

Tests jāizdara tumsā nemainīgā temperatūrā no 10 līdz 30 °C diapazonā. Piemērota temperatūra ir (20 ± 2) °C. Attiecīgā gadījumā var apsvērt papildu zemāku temperatūru (piemēram, 10 °C) katrā atsevišķā gadījumā atkarībā no informācijas, kas jāiegūst testā. Inkubēšanas temperatūra ir jāuzrauga un jāreģistrē.

▼B

1.9.2. **Testējamās vielas apstrāde un pielietošana**

Izmanto vienu ķīmiskās vielas testa koncentrāciju ([1]) 9. Kultūraugu aizsardzības ķīmiskajām vielām, ko tieši pielieto ūdens struktūrās, maksimālā deva, kas ir uz etiķetes, jāuzskata par maksimālo lietojuma devu, ko aprēķina, pamatojoties uz ūdens virsmas laukumu testa tvertnē. Visos citos gadījumos izmantojamā koncentrācija jāpamato uz prognozēm no emisijām vidē. Jāpievērš vērība, lai nodrošinātu, ka tiek pielietota atbilstoša testējamās vielas koncentrācija transformācijas ceļu un transformācijas produktu veidošanās un samazināšanās raksturošanai. Var būt nepieciešams pielietot lielākas devas (piemēram, 10 reižu) situācijās, kad testējamās vielas koncentrācijas ir tuvas noteikšanas robežai pētījuma sākumā un/vai kad galvenos transformācijas produktus nevar viegli noteikt, kaut arī to daļa ir 10 % no testējamās vielas lietojuma devas. Tomēr, ja izmanto lielākas testa koncentrācijas, tām nedrīkst būt ievērojama kaitīga iedarbība uz ūdens–nosēdumu sistēmas mikrobu aktivitāti. Lai sasniegtu nemainīgu testējamās vielas koncentrāciju dažādu izmēru tvertnēs, var apsvērt, vai nav lietderīgi pielietojamā materiāla daudzumu koriģēt, pamatojoties uz ūdens staba dziļumu tvertnē attiecībā pret ūdens dziļumu laukā (ko pieņem par 100 cm, bet var izmantot citu dziļumu). Aprēķina piemēru skatīt 4. papildinājumā.

Ideālā gadījumā testējamā viela jāpielieto kā ūdens šķīdums testa sistēmas ūdens fāzē. Ja no tā nevar izvairīties, testējamās vielas pielietošanai un izplatīšanai ir atļauts lietot mazus daudzumus ar ūdeni sajaucamu šķīdinātāju (tādu kā acetons, etanols), bet tie nedrīkst pārsniegt 1 % tilp./tilp. un tiem nedrīkst būt kaitīga iedarbība uz testa sistēmas mikrobu aktivitāti. Jārīkojas uzmanīgi, veidojot testējamās vielas ūdens šķīdumu – var būt piemēroti izmantot šķīduma veidošanas kolonnas un iepriekšēju maisīšanu, lai nodrošinātu pilnīgu viendabīgumu. Pēc ūdens šķīduma pievienošanas testa sistēmai ir ieteicams uzmanīgi maisīt ūdens fāzi, iespējami maz skarot nosēdumus.

Preparātu izmantošana parasti nav ieteicama, jo preparāta sastāvdaļas var ietekmēt testējamās vielas un/vai transformācijas produktu sadalījumu starp ūdens un nosēdumu fāzēm. Tomēr slikti šķīstošām testējamām vielām preparātu izmantošana var būt piemērota alternatīva.

Inkubācijas tvertņu skaits ir atkarīgs no paraugu ņemšanas reižu skaita (skatīt 1.9.3. punktu). Ir jāiekļauj pietiekams testa sistēmu skaits, lai katrā paraugu ņemšanas reizē varētu iztērēt divas sistēmas. Izmantojot katras ūdens nosēdumu sistēmas kontroles vienības, tās nav jāapstrādā ar testējamo vielu. Kontroles vienības var izmantot, lai noteiktu nosēdumu mikrobu biomasu un ūdens un nosēdumu kopējo organisko oglekli pētījuma beigās. Divas no kontroles vienībām (t. i., vienu kontroles vienību katram ūdens nosēdumam) var izmantot, lai pārraudzītu vajadzīgos rādītājus nosēdumos un ūdenī aklimatizācijas periodā (skatīt tabulu 1.8.2.2. punktā). Divas papildu kontroles vienības ir jāiekļauj, ja testējamo vielu pielieto, izmantojot šķīdinātāju, lai izmērītu kaitīgo iedarbību uz testa sistēmas mikrobu aktivitāti.

([1]) Tests ar otru koncentrāciju var būt noderīgs attiecībā uz ķīmiskajām vielām, kas sasniedz ūdens virsmu dažādos veidos, kādēļ rodas ievērojami atšķirīgas koncentrācijas, ciktāl mazāko koncentrāciju var analizēt ar pietiekamu precizitāti.

▼B

1.9.3. **Testa ilgums un paraugu ņemšana**

Eksperimenta ilgumam parasti nav jāpārsniedz 100 dienas (6), un tam jāturpinās, līdz ir noskaidrots noārdīšanās ceļš un sadalījuma modelis sistēmā ūdens–nosēdumi vai kad 90 % testējamās vielas ir izkliedēti transformējoties un/vai gaistot. Paraugu ņemšanas reizēm jābūt vismaz sešām (iekļaujot nulles reizi) ar neobligātu priekšpētījumu (skatīt 1.9.4. punktu), ko izmanto piemērota paraugu ņemšanas režīma un testa ilguma izveidošanai, ja vien pietiekami dati par testējamo vielu nav pieejami no iepriekšējiem pētījumiem. Hidrofobām testējamām vielām pētījuma sākumposmā var būt vajadzīgas papildu paraugu ņemšanas reizes, lai noteiktu sadalījuma attiecību starp ūdens un nosēdumu fāzēm.

Piemērotās paraugu ņemšanas reizēs analīzei izņem visu inkubācijas tvertņu (ar atkārtojuma tvertni). Nosēdumus un virs tiem esošo ūdeni analizē atsevišķi ([1]) 0. Virsmas ūdens ir uzmanīgi jāatdala, iespējami maz skarot nosēdumus. Testējamās vielas un transformācijas produktu ekstrakcija un raksturošana jāizdara, ievērojot atbilstošās analīzes procedūras. Jārūpējas, lai noņemtu materiālu, kas varētu būt adsorbējies uz inkubācijas tvertnes vai uz savienotājiem cauruļvadiem, kurus izmanto gaistošo vielu uztveršanai.

1.9.4. **Neobligāts iepriekšējais tests**

Ja ilgumu un paraugu ņemšanas režīmu nevar novērtēt no citiem attiecīgajiem pētījumiem ar testējamo vielu, var uzskatīt par atbilstošu neobligātu iepriekšējo testu, kas jāizdara tādos pašos testa apstākļos kā galīgajam pētījumam paredzētie. Īsi jāreģistrē attiecīgie iepriekšējā testa eksperimenta apstākļi un rezultāti, ja veic iepriekšējo testu.

1.9.5. **Mērījumi un analīze**

Katrā paraugu ņemšanas reizē ir jāmēra un jāreģistrē testējamās vielas un transformācijas produktu koncentrācija (kā pielietotā koncentrācija un kā procentuālais daudzums). Parasti ir jāidentificē transformācijas produkti, kas konstatēti pie $\geq$ 10 % no pielietotās radioaktivitātes kopējā ūdens–nosēdumu sistēmā jebkurā paraugu ņemšanas reizē, ja nav pienācīgi pamatots citādi. Jāapsver arī to transformācijas produktu identificēšana, kuru koncentrācija pētījuma laikā nepārtraukti palielinās, pat ja to koncentrācijas nepārsniedz iepriekš norādītās robežas, jo tas var norādīt uz noturību. Pēdējā minētā jāapsver katrā atsevišķā gadījumā, pārskatā sniedzot pamatojumu.

Katrā paraugu ņemšanas reizē ir jāreģistrē gāzu/gaistošo vielu (CO_2 un citu, t. i., gaistošo organisko savienojumu) uztveršanas sistēmu rezultāti Jāreģistrē mineralizācijas ātrumi. Katrā paraugu ņemšanas reizē jāreģistrē neekstrahējamās (saistītās) nogulsnes nosēdumos.

([1]) Ja viegli var notikt anaerobās transformācijas produktu ātra reoksidācija, anaerobi apstākļi ir jāsaglabā paraugu ņemšanas un analīzes laikā.

▼B

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Katrā paraugu ņemšanas reizē jāaprēķina kopējā masas bilance vai pievienotās radioaktivitātes atgūstamība (skatīt 1.7.1. punktu). Rezultāti jāreģistrē kā pievienotās radioaktivitātes procenti. Katrā paraugu ņemšanas reizē jāreģistrē radioaktivitātes sadalījums starp ūdeni un nosēdumiem kā koncentrācija un procentuālais daudzums.

Jāaprēķina testējamās vielas pussabrukšanas periods, DT_{50} un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} ar to ticamības robežām (skatīt 1.7.3. punktu). Informāciju par testējamās vielas izkliedēšanās ātrumu ūdenī un nosēdumos var iegūt, izmantojot attiecīgus vērtēšanas rīkus. Tie var būt diapazonā no pseido pirmās kārtas kinētikas pielietošanas, empīriskas līknes pielāgošanas metodes, kas izmanto grafiskus vai skaitliskus risinājumus, līdz sarežģītākiem pieņēmumiem, kas izmanto, piemēram, viena vai vairāku nodalījumu modeļus. Sīkākus datus var iegūt attiecīgajā literatūras sarakstā (35) (36) (37).

Visām pieejām ir stiprās un vājās puses un ievērojamas atšķirības sarežģītībā. Pieņēmums par pirmās kārtas kinētiku var būt noārdīšanās un sadalījuma procesu pārāk liels vienkāršojums, bet, ja iespējams, sniedz terminu (ātruma konstanti vai pussabrukšanas periodu), kas ir viegli saprotams un vērtīgs simulācijas modelēšanā un paredzamo vides koncentrāciju aprēķinos. Empīriskās pieejas vai lineārās transformācijas var sniegt labāku līkņu atbilstību datiem un tādēļ dot iespēju labāk novērtēt pussabrukšanas periodus, DT_{50} un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} vērtības. Atvasināto konstanšu lietojums tomēr ir ierobežots. Ar nodalījumu modeļiem var iegūt riska novērtēšanai vairākas noderīgas konstantes, kas apraksta noārdīšanās ātrumu dažādos nodalījumos un ķīmiskās vielas sadalījumu. Tie arī jāizmanto galveno transformācijas produktu rašanās un noārdīšanās ātruma konstanšu noteikšanai. Visos gadījumos izraudzītā metode ir jāpamato, un eksperimentatoram grafiski un/vai statistiski jāparāda, cik labi tā piemērota.

3. **PĀRSKATA SAGATAVOŠANA**

3.1. PĀRSKATS PAR TESTU

Pārskatā jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā viela:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula (norādot marķējuma(-u) vietu, ja izmanto radioaktīvi marķētu materiālu) un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības,

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi),

— marķēto ķīmisko vielu radioķīmiskā tīrība un īpatnējā aktivitāte (attiecīgā gadījumā).

▼B

Standartvielas:

— transformācijas produktu raksturošanai un/vai identifikācijai izmantoto standartvielu ķīmiskais nosaukums un struktūra.

Testa nosēdumi un ūdeņi:

— ūdens nosēdumu paraugu ņemšanas vietas(-u) atrašanās un apraksts, iekļaujot, ja iespējams, piesārņošanas vēsturi,

— visa informācija par ūdens–nosēdumu sistēmas vākšanu, glabāšanu (ja tā notikusi) un aklimatizāciju;

— ūdens–nosēdumu paraugu raksturojums, kā uzskaitīts 1.8.2.2. punkta tabulā.

Testa apstākļi:

— izmantotā testa sistēma (piemēram, caurplūdes, biometra, ventilācijas veids, kratīšanas metode, ūdens tilpums, nosēdumu masa, ūdens slāņa un nosēdumu slāņa biezums, testa tvertņu izmēri utt.),

— testējamās vielas pielietošana testa sistēmā – izmantotā testa koncentrācija, atkārtojumu un kontroles mēģinājumu skaits, testējamās vielas pielietošanas veids (piemēram, šķīdinātāja izmantošana, ja to izmanto) utt.,

— inkubēšanas temperatūra,

— paraugu ņemšanas reizes,

— ekstrakcijas metodes un to efektivitāte, kā arī analīzes metodes un noteikšanas robežas,

— transformācijas produktu raksturošanas/identifikācijas metodes,

— novirzes no testa protokola vai testa apstākļiem pētījuma laikā.

Rezultāti:

— reprezentatīvu analīžu izejas dati skaitļos (visi izejas dati jāglabā labas laboratorijas prakses arhīvā),

— izmantoto analīzes metožu atkārtojamība un jutība,

— atgūstamība (% vērtības derīgam pētījumam ir sniegtas 1.7.1. punktā),

— tabulas ar rezultātiem, kas izteikti kā pielietotās devas % un kā $mg.kg^{-1}$ ūdenī, nosēdumos un visā sistēmā (tikai %) testējamai vielai un attiecīgā gadījumā transformācijas produktiem un neekstrahējamai radioaktivitātei,

— masas bilance pētījuma laikā un beigās,

— transformācijas grafiskais attēlojums ūdens un nosēdumu frakcijās un visā sistēmā (iekļaujot mineralizāciju),

— mineralizācijas ātrumi,

▼B

— testējamās vielas un attiecīgā gadījumā galveno transformācijas produktu pussabrukšanas periods, DT_{50} un attiecīgā gadījumā DT_{75} un DT_{90} vērtības ūdenī, nosēdumos un visā sistēmā, iekļaujot ticamības robežas,

— testējamās vielas un attiecīgā gadījumā galveno transformācijas produktu transformācijas kinētikas novērtējums,

— ierosinātie transformācijas ceļi attiecīgā gadījumā,

— rezultātu apspriešana.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

(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. 35–37.

(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, 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.), 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, p. 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, p. 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, p. 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.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, p. 2858–2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, p. 329–338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, p. 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), p. 13–21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, p. 850–857.

(30) 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, p. 1527–1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, p. 1499–1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 1349–1354.

▼B

1. PAPILDINĀJUMS

NORĀDĪJUMI PAR AEROBĀM UN ANAEROBĀM TESTA SISTĒMĀM

Aerobā testa sistēma

Šajā testa metodē aprakstītā aerobā testa sistēmas sastāv no aeroba ūdens slāņa (parastais skābekļa koncentrāciju diapazons no 7 līdz 10 $mg \cdot l^{-1}$) un nosēdumu slāņa, kas ir aerobs pie virsmas un anaerobs zem virsmas (parastais vidējā redokspotenciāla (E_h) diapazons nosēdumu anaerobajā zonā ir –80 līdz –190 mV). Katrā inkubācijas vienībā pāri ūdens virsmai laiž samitrinātu gaisu, lai uzturētu pietiekamu skābekļa daudzumu brīvajā telpā.

Anaerobā testa sistēma

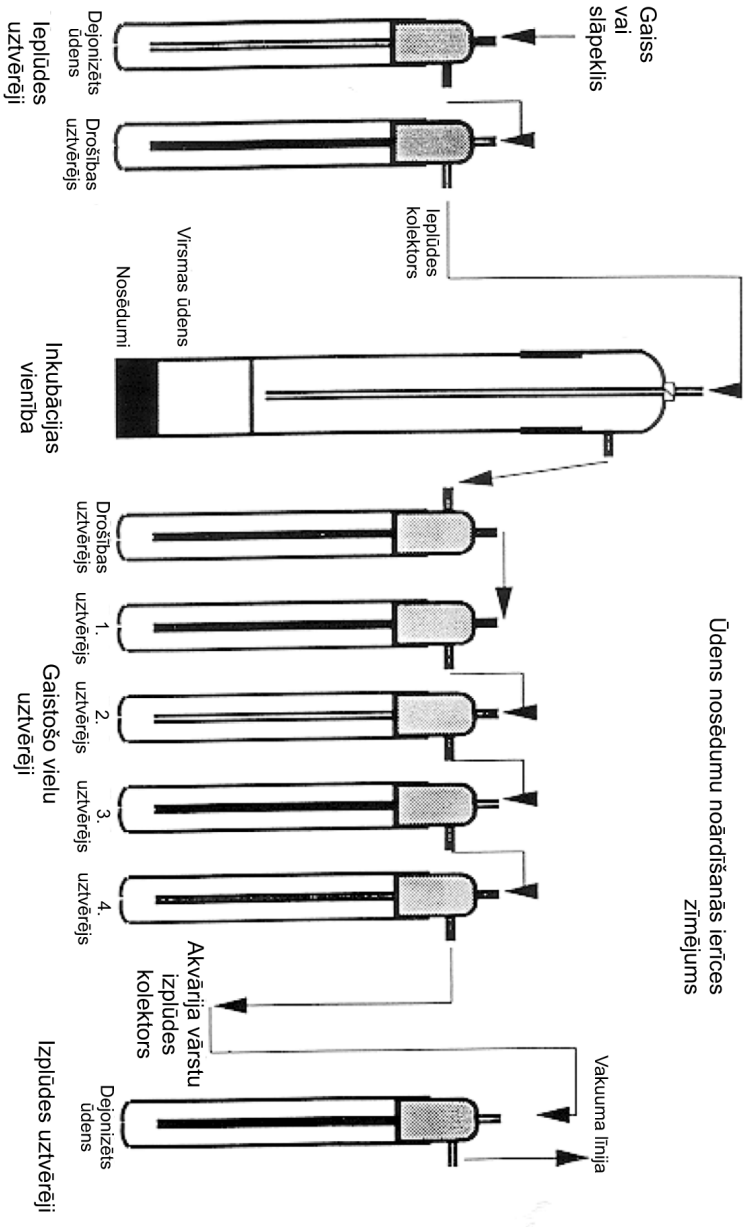
Anaerobā testa sistēmai testa procedūra ir faktiski tā pati, kas izklāstīta attiecībā uz aerobo sistēmu, izņemot to, ka pāri ūdens virsmai katrā inkubācijas vienībā laiž mitru slāpekli, lai saglabātu slāpekli brīvajā telpā. Nosēdumus un ūdeni uzskata par anaerobu, ja redokspotenciāls (E_h) ir zemāks par –100 mV.

Anaerobajā testā mineralizācijas novērtējums iekļauj izdalītā oglekļa dioksīda un metāna mērīšanu.

▼B

2. PAPILDINĀJUMS

GĀZES CAURPLŪDES APARĀTA PIEMĒRS

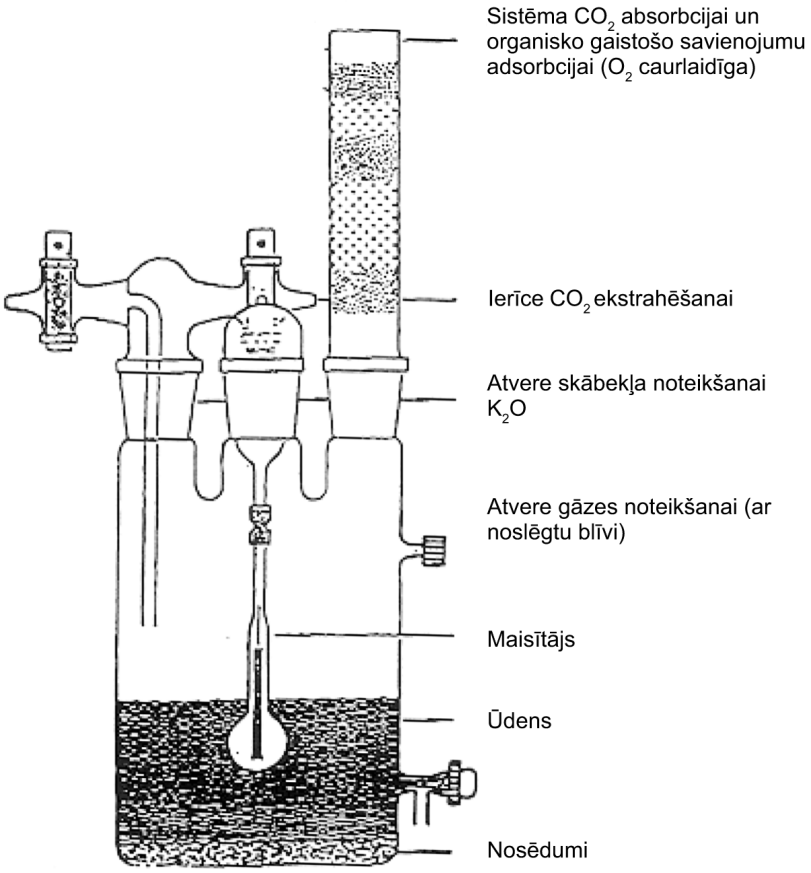


Drošības uztvērējs, tukšs
1. uztvērējs - etilēnglikols paredzēts, lai uztvertu organiskās gaistošās vielas
2. uztvērējs - 0,1 M sērskābe paredzēta, lai uztvertu sārmainās gaistošās vielas
3. un 4. uztvērējs- 2 M nātrija hidroksīds paredzēts, lai uztvertu CO_2 un citas skābās gaistošās vielas

▼B

3. PAPILDINĀJUMS

EXAMPLE OF A BIOMETER APPARATUS



Magnētiskais maisītājs

▼B

4. PAPILDINĀJUMS

LIETOJUMA DEVAS APRĒĶINA PIEMĒRRS TESTA TVERTNĒM

Cilindra iekšējais diametrs:	= 8 cm
Ūdens staba augstums, neiekļaujot nosēdumus:	= 12 cm
Virsmas laukums: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Lietojuma deva – 500 g testējamās vielas/ha atbilst 5 µg/cm^2	
Kopā µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
Koriģējiet daudzumu attiecībā uz 100 cm dziļumu: 12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Ūdens staba tilpums: 50,3 × 12	= 603 ml
Koncentrācija ūdenī: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml vai 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROBĀ MINERALIZĀCIJA VIRSZEMES ŪDENĪ – BIOLOĢISKĀS NOĀRDĪŠANĀS IMITĀCIJAS TESTS

1. METODE

Šī metode ir līdzvērtīga metodei OECD TG 309 (2004) (1)

1.1. IEVADS

Pēc šīs metodes nosaka testējamās vielas bioloģiskās noārdīšanās gaitu mazās koncentrācijās aerobos apstākļos dabīgā ūdenī, un novērojumus kvantitatīvi izsaka ar kinētisko ātrumu. Šis imitācijas tests ir laboratorijas metode, izmantojot paraugu sēriju kratīšanu kolbās, lai noteiktu organisko vielu aerobās bioloģiskās noārdīšanās ātrumu dabīgā virszemes ūdens (saldūdens, sāļūdens vai jūras ūdens) paraugos. Tās pamatā ir ISO/DIS 14592–1 (2), iekļaujot arī C.23. un C.24. testēšanas metodes (3)(4) elementus. Lai novērstu testa mikrovides bojāšanos ilgstošas testēšanas laikā, darbības ar paraugu sērijām var aizstāt ar pusnepārtraukto paņēmienu. Imitācijas testa galvenais mērķis ir noteikt testējamās vielas mineralizāciju virszemes ūdenī, un noārdīšanās kinētiku izsaka pēc mineralizācijas. Otrs sekundārais mērķis ir iegūt informāciju par primāro noārdīšanos un galveno pārveidošanās produktu veidošanos. Pārveidošanās produktu identificēšana un, ja iespējams, to koncentrāciju kvantitatīva noteikšana ir īpaši svarīga vielām, kas mineralizējas ļoti lēni (piemēram, vielām, kuru kopējā atlikuma ^{14}C sadalīšanās pusperiods pārsniedz 60 dienas). Galveno pārveidošanās produktu identificēšanai analītisko ierobežojumu dēļ parasti ir jāizmanto lielākas testējamās vielas koncentrācijas (piemēram, > 100 μg/l).

Zema koncentrācija šajā metodē nozīmē koncentrāciju (piemēram, mazāku par 1 μg/l līdz 100 μg/l), kas ir pietiekami maza, lai nodrošinātu, ka testēšanas apstākļos noteiktā bioloģiskās noārdīšanās kinētika raksturo dabas vidē sagaidāmo. Salīdzinājumā ar bioloģiski noārdāmu oglekli saturošo vielu kopējo masu, ko satur testā izmantojamais dabīgais ūdens, testējamā viela mazā koncentrācijā kalpo kā sekundārais substrāts. Tas nozīmē, ka sagaidāmās bioloģiskās noārdīšanās reakciju kinētika ir pirmās kārtas ("neaugoša" kinētika) un ka testējamā viela var noārdīties "kometabolisma" procesā. Pirmās kārtas noārdīšanās reakcijās noārdīšanās ātrums (mg/l/dienā) ir proporcionāls substrāta koncentrācijai, kura samazinās laikā. Īstas pirmās kārtas kinētikas gadījumā īpatnējā noārdīšanās ātruma konstante k nav atkarīga no laika un koncentrācijas. Tas ir, k ievērojami nemainās eksperimenta laikā un nemainās, palielinot koncentrāciju citā eksperimentā. Pēc definīcijas īpatnējā noārdīšanās ātruma konstante ir vienāda ar koncentrācijas relatīvajām izmaiņām laikā: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Kaut arī šeit norādītajos apstākļos parasti ir sagaidāma pirmās kārtas kinētika, var būt gadījumi, kad procesu labāk apraksta citi kinētisko reakciju mehānismi. Novirzes no pirmās kārtas kinētikas var būt novērojamas, piemēram, ja bioloģiskās pārveidošanās ātrumu ierobežo nevis pašu bioloģisko reakciju ātrums, bet ar masas pārneses procesiem saistītās parādības, piemēram, difūzijas ātrums. Tomēr datus gandrīz vienmēr var aprakstīt ar pseidopirmās kārtas kinētiku, izmantojot no koncentrācijas atkarīgu reakcijas ātruma konstanti.

▼M1

Lai atvieglotu eksperimenta plānošanu un rezultātu interpretāciju, pirms testa jābūt pieejamai informācijai par testējamās vielas bioloģisko noārdīšanos lielākās koncentrācijās (piemērm, no standarta skrīninga testiem), kā arī informācijai par abiotisko noārdīšanos, pārveidošanās produktiem un attiecīgajām fizikāli ķīmiskajām īpašībām. Ar ^{14}C iezīmētu testējamo vielu izmantošana un ^{14}C fāzu sadalījuma noteikšana testēšanas beigās dod iespējas noteikt galīgo bioloģisko noārdīšanos. Ja izmanto ar izotopiem neiezīmētu testējamo vielu, galīgo bioloģisko noārdīšanos var noteikt, tikai testējot to augstākās koncentrācijās, un ja ir zināmi visi tās svarīgākie pārveidošanās produkti.

1.2. DEFINĪCIJAS

Primārā bioloģiskā noārdīšanās: vielas struktūras izmaiņas (pārveidošanās) mikroorganismu iedarbībā, kuru dēļ zūd tās ķīmiskā identitāte.

Funkcionālā bioloģiskā noārdīšanās: vielas struktūras izmaiņas (pārveidošanās) mikroorganismu iedarbībā, kuru dēļ zūd kāda tās specifiska īpašība.

Galīgā aerobā bioloģiskā noārdīšanās: vielas noārdīšanās skābekļa klātbūtnē līdz oglekļa dioksīdam, ūdenim un citu klātesošo elementu minerālsāļiem (mineralizācija) mikroorganismu iedarbībā, veidojoties jaunai biomasai un jaunām organiskām vielām, kas ir mikrobu biosintēzes produkti.

Mineralizācija: vielas noārdīšanās skābekļa klātbūtnē līdz oglekļa dioksīdam, ūdenim un citu klātesošo elementu minerālsāļiem mikroorganismu iedarbībā.

Kavēšanās fāze: laiks no testēšanas sākuma līdz noārdošo mikroorganismu adaptācijai, kurā vielas vai organiskā materiāla bioloģiskās noārdīšanās pakāpe ir sasniegusi nosakāmu līmeni (piemēram, 10 % no maksimālās teorētiskās vai mazāk, atkarībā no noteikšanas metodes precizitātes).

Bioloģiskās noārdīšanās maksimālais līmenis: vielas vai organiskā materiāla procentos izteikta bioloģiskās noārdīšanās pakāpe testa apstākļos, virs kuras testēšanas laikā turpmāka bioloģiskā noārdīšanās nenotiek.

Primārais substrāts: dabīgā oglekļa un enerģijas avotu kopums, kas nodrošina mikrobu biomasas augšanu un uzturēšanu.

Sekundārais substrāts: komponents, kas substrātā ir tik zemā koncentrācijā, ka tam noārdoties, aktīvajiem mikroorganismiem tiek piegādāti tikai nenozīmīgi oglekļa un enerģijas daudzumi, salīdzinot ar galveno substrāta komponentu (primāro substrātu) noārdīšanā piegādāto oglekli un enerģiju.

Noārdīšanās ātruma konstante: pirmās kārtas vai pseidopirmās kārtas kinētiskās reakcijas ātruma konstante k (d^{-1}), kas raksturo noārdīšanās procesu ātrumu. Eksperimentāli k nosaka no noārdīšanās līknes sākuma daļas, ko iegūst pēc kavēšanās fāzes beigām.

▼M1

Pussadalīšanās periods, $t_{1/2}$ (d): termins, ko izmanto, lai raksturotu pirmās kārtas reakcijas ātrumu. Tas ir laika intervāls, kurā koncentrācija samazinās 2 reizes. Pussadalīšanās perioda un noārdīšanās ātruma konstantes savstarpējo sakarību izsaka ar vienādojumu $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Pusnoārdīšanās laiks, DT_{50} (d): termins, ko izmanto, lai kvantitatīvi izteiktu bioloģiskās noārdīšanās testēšanas rezultātus. Tas ir laika intervāls, iekļaujot kavēšanās fāzi, kas vajadzīgs, lai bioloģiskās noārdīšanās pakāpe sasniegtu 50 %.

Noteikšanas robeža (*LOD*) un kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*): kvalitatīvās noteikšanas robeža (*LOD*) ir vielas koncentrācija, zem kuras vielas identitāte nav atšķirama no analītiskiem artefaktiem. Kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*) ir vielas koncentrācija, zem kuras tā nav nosakāma ar pieņemamu precizitāti.

Izšķīdušais organiskais ogleklis (*DOC*): ūdens paraugā esošā tā organiskā oglekļa daļa, ko nevar atdalīt ar norādīto fāzu atdalīšanu, piemēram, ar centrifugēšanu pie 40 000 ms^{-2} 15 min vai ar membrānas filtrāciju, izmantojot membrānas ar porām 0,2 μm–0,45 μm diametrā.

Kopējā organiskā ^{14}C aktivitāte (*TOA*): kopējā ^{14}C aktivitāte, kas saistīta ar organisko oglekli.

Izšķīdušā organiskā ^{14}C aktivitāte (DOA): kopējā ^{14}C aktivitāte, kas saistīta ar izšķīdušo organisko oglekli.

Daļiņu organiskā ^{14}C aktivitāte (POA): kopējā ^{14}C aktivitāte, kas saistīta ar daļiņu organisko oglekli.

1.3. TESTA PIELIETOJAMĪBA

Šis imitācijas tests ir pielietojams negaistošām vai maz gaistošām organiskām vielām, ko testē mazās koncentrācijās. Lietojot kolbas, kurās var piekļūt atmosfēras gaiss (piemēram, ar vates aizbāžņiem), vielas, kuru ar Henrija konstante ir mazāka par aptuveni 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (apm. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), var uzskatīt par praktiski negaistošām. Lietojot noslēgtas kolbas ar augšpusē tukšu telpu, ir iespējams bez zudumiem no testēšanas sistēmas testēt maz gaistošas vielas (Henrija konstante < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ jeb < 10^{3} $atm \cdot m^3/mol$). Var notikt ar ^{14}C iezīmēto vielu zudums, ja neveic pasākumus ar CO_2 izdalīšanos saistīto zudumu novēršanai. Tādā situācija var būt nepieciešams uztvert CO_2 iekšējā absorberā ar sārmu vai izmantot ārējo CO_2 absorbcijas sistēmu (tieša $^{14}CO_2$ noteikšana, sk. 3. pielikumu). Bioloģiskās noārdīšanās kinētikas noteikšanai testējamās vielas koncentrācijām jābūt mazākām par tās šķīdību ūdenī. Tomēr jāatzīmē, ka šķīdība ūdenī pēc literatūras datiem var būt ievērojami augstāka par testējamās vielas šķīdību dabīgajos ūdeņos. Īpaši slikti šķīstošu testējamo vielu šķīdību var noteikt, izmantojot testam lietojamos dabīgos ūdeņus.

Metodi var izmantot bioloģiskās noārdīšanās imitācijai virszemes ūdenī, kurā nav rupju daļiņu (pelaģiskais tests) vai duļķainā virszemes ūdenī, piemēram, ūdenī tuvu ūdens/nosēdumu robežvirsmai (suspendēto nosēdumu tests).

▼M1

1.4. TESTA PRINCIPS

Testu veic sēriju veidā, inkubējot testējamo vielu tikai ar virszemes ūdeni (pelaģiskais tests) vai ar virszemes ūdeni, kam pievienotas suspendētas cietās daļiņas/sedimenti 0,01 līdz 1 g/l sausnas masas (suspendēto sedimentu tests), lai imitētu ūdeni ar suspendētām cietām daļiņām vai atkārtoti suspendētiem sedimentiem. Suspendēto cieto daļiņu/sedimentu koncentrācija minētā intervāla zemākajā daļā ir tipiska lielākajai daļai virszemes ūdeņu. Testa kolbas inkubē tumsā apkārtējās vides temperatūrā aerobos apstākļos kratot. Lai noteiktu noārdīšanās kinētiku, ir jāizmanto vismaz divas dažādas testējamās vielas koncentrācijas. Koncentrācijām savā starpā ir jāatšķiras 5 līdz 10 reizes, un jāatbilst vides apstākļos sagaidāmajam koncentrāciju diapazonam. Testējamās vielas maksimālā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 μg/l, bet vēlama ir maksimālā testējamās vielas koncentrācija 10 μg/l vai mazāka, lai nodrošinātu, ka bioloģiskā noārdīšanās notiek atbilstoši pirmās kārtas kinētikai. Mazākā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 10 μg/l, bet vēlamā mazākās testējamās vielas koncentrācijas ir 1–2 μg/l, vai mazākas par 1 μg/l. Parasti šādas mazas koncentrācijas var pareizi noteikt, izmantojot komerciāli pieejamas ar ^{14}C izotopu iezīmētas vielas. Analītisko ierobežojumu dēļ bieži nav iespējams izmērīt testa vielas koncentrāciju ar vajadzīgo precizitāti, ja testējamās vielas koncentrācija ≤ 100 μg/l (sk. 1.7.2. iedaļas otro rindkopu). Lielākas testējamās vielas koncentrācijas (> 100 μg/l un dažreiz > 1 mg/l) var izmantot galveno pārveidošanās produktu identificēšanai un kvantitatīvai noteikšanai vai gadījumā, ja nav pieejama specifiska analīzes metode ar pietiekami zemu noteikšanas robežu. Ja testējamās vielas koncentrācija ir augsta, iegūtie rezultāti var nebūt izmantojami pirmās kārtas noārdīšanās reakcijas konstantes un pussadalīšanās perioda noteikšanai, jo noārdīšanās, iespējams, var neatbilst pirmās kārtas kinētikai.

Noārdīšanās procesu kontrolē piemērotos laika intervālos, mērot atlikušā ^{14}C izotopa vai testējamās vielas atlikušo koncentrāciju, ja izmanto specifisku ķīmisko analīzi. Molekulas stabilākās daļas iezīmēšana ar ^{14}C nodrošina kopējās mineralizācijas noteikšanu, bet mazāk stabilās molekulas daļas iezīmēšana ar ^{14}C, kā arī specifiskas analīzes izmantošana dod iespēju novērtēt tikai primāro bioloģisko noārdīšanos. Tomēr stabilākā daļa ne vienmēr iekļauj molekulas attiecīgo funkcionālo grupu (kura var būt saistīta ar specifisku īpašību, tādu kā toksiskums, bioakumulācija, u. c.). Tādā gadījumā, lai izsekotu specifiskas īpašības zušanu, var būt lietderīgi izmantot funkcionālajā daļā ar ^{14}C izotopu iezīmētu testējamo vielu.

1.5. INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

Šajā testā var izmantot gan ar radioaktīvajiem izotopiem iezīmētas, gan neiezīmētas vielas. Ieteicams izmantot iezīmēšanas metodi ar ^{14}C, un marķierim parasti jābūt molekulas stabilākajā(-ās) daļā(-ās) (sk. arī 1.4. iedaļu). Vielām, kas satur vairākus aromātiskos gredzenus, vēlams ar ^{14}C iezīmēt vismaz vienu oglekļa atomu katrā gredzenā. Turklāt ir vēlams ar ^{14}C iezīmēt vienu vai vairākus oglekļa atomus abās pusēs no viegli noārdāmām saitēm. Testējamās vielas ķīmiskajai un/vai radioķīmiskajai tīrībai jābūt > 95 %. Ar radioaktīvajiem izotopiem iezīmētām vielām vēlamā īpatnējā aktivitāte ir aptuveni 50 μCi/mg (1,85 MBq) vai augstāka, lai atvieglotu ^{14}C mērījumus testos, ko izdara ar mazām sākotnējām koncentrācijām. Par testējamo vielu jābūt pieejamai šādai informācijai:

▼M1

— šķīdība ūdenī [A.6. metode],

— šķīdība organiskos šķīdinātājos (vielām, kuras pielieto ar šķīdinātāju vai kuras slikti šķīst ūdenī),

— disociācijas konstante (pKa), ja vielai ir tieksme pievienot vai zaudēt protonus [OECD TG 112] (5),

— tvaika spiediens [A.4. metode] un Henrija konstante,

— ķīmiskā stabilitāte ūdenī un tumsā (hidrolīze) [C.7. metode].

Ja ūdenī slikti šķīstošas vielas testē jūras ūdenī, var būt noderīgi arī zināt izsālīšanās konstanti (jeb Sečenova konstanti) K^s, ko aprēķina pēc vienādojuma: log (S/S') = K^s C_m, kur S un S' attiecīgi ir vielas šķīdība saldūdenī un jūras ūdenī un C_m ir sāls molārā koncentrācija.

Ja testēšanu veic "suspendēto sedimentu testa" veidā, jābūt pieejamai arī šādai informācijai:

— sadalījuma koeficients sistēmā n-oktanols/ūdens [A.8. metode],

— adsorbcijas koeficients [C.18. metode].

Cita noderīga informācija var būt:

— koncentrācija vidē, ja tā ir noteikta vai aprēķināta,

— testējamās vielas toksiskums mikroorganismiem [C.11. metode],

— bioloģiskās noārdīšanās spēja un/vai potenciālā bioloģiskā noārdāmība [metodes C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— bioloģiskās noārdīšanās spēja augsnē aerobos vai anaerobos apstākļos un sedimentu/ūdens transformācijas pētījumi [C.23., C.24. metode].

1.6. STANDARTVIELAS

Par standartvielu jāizmanto viela, kas parasti viegli noārdās aerobos apstākļos (piemēram, anilīns vai nātrija benzoāts). Sagaidāmais anilīna un nātrija benzoāta noārdīšanās laika intervāls parasti ir mazāks par 2 nedēļām. Standartvielu izmantošanas nolūks ir nodrošināt, ka testa ūdens mikrobu aktivitāte ir zināmās robežās, t. i., ka ūdens satur aktīvu mikrobu populāciju.

▼M1

1.7. KVALITĀTES KRITĒRIJI

1.7.1. **Atgūstamība**

Tūlīt pēc testējamās vielas pievienošanas katra sākotnējā testējamā koncentrācija ir jāpārbauda, mērot ^{14}C aktivitāti, vai veicot neiezīmētu vielu ķīmisko analīzi vismaz dublikātu paraugiem. Tas sniedz informāciju par analītiskās metodes pielietojamību, par tās atkārtojamību un par testējamās vielas sadalījuma viendabīgumu. Parasti izmērīto sākotnējo ^{14}C aktivitāti vai testējamās vielas faktisko koncentrāciju – un nevis nominālo koncentrāciju – izmanto turpmākajai datu analīzei, jo ar to kompensē sorbcijas radītos zudumus un dozēšanas kļūdas. Ar ^{14}C iezīmētas testējamās vielas atgūstamību eksperimenta beigās nosaka pēc masas bilances (sk. 1.8.9.4. iedaļas pēdējo rindkopu). Ideālā gadījumā ar radioaktīvo izotopu iezīmētas vielas masas bilancei jābūt diapazonā no 90 % līdz 110 %, ievērojot, ka neiezīmētu testa vielu analītiskajai precizitātei jānodrošina sākotnējā atgūstamība 70 % līdz 110 %. Norādītie diapazoni uzskatāmi par mērķa vērtībām, un tie nav jāizmanto kā testēšanas rezultātu pieņemamības kritēriji. Analītisko precizitāti testējamai vielai var noteikt pie zemākas koncentrācijas nekā sākotnējā koncentrācija, vai arī to noteikt svarīgākajiem pārveidošanās produktiem.

1.7.2. **Analītiskās metodes atkārtojamība un jutība**

Analītiskās metodes atkārtojamība (arī sākotnējās ekstrakcijas efektivitāte) testējamās vielas vai attiecīgos gadījumos svarīgāko pārveidošanās produktu kvantitatīvai noteikšanai jāpārbauda ar virszemes ūdens piecu atsevišķu ekstraktu atkārtotām analīzēm.

Testējamās vielas un pārveidošanās produktu analītiskās metodes kvalitatīvās noteikšanas robežai (*LOD*), ja iespējams, jābūt vismaz 1 % no testēšanas sistēmā pievienotā sākotnējā daudzuma. Kvantitatīvās noteikšanas robežai (*LOQ*) jābūt vienādai vai mazākai par 10 % no izmantotās koncentrācijas. Daudzu organisko vielu un to pārveidošanās produktu ķīmiskajai analīzei bieži nepieciešams, lai testējamās vielas koncentrācija būtu relatīvi augsta, t. i., > 100 µg/l.

1.8. TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

1.8.1. **Aparatūra**

Testu var veikt piemērota tilpuma (piemēram 0,5 vai 1,0 l) koniskajās vai cilindriskajās kolbās, kas noslēgtas ar silikona vai gumijas aizbāžņiem, vai seruma kolbās ar CO_2 necaurlaidīgiem vāciņiem (piemēram, ar butilkaučuka blīvēm). Testu var veikt arī ar vairākām kolbām vienam variantam, un analīzei ņem visas kolbas saturu, katrā paraugu intervālā vismaz divos atkārtojumos (sk. 1.8.9.1. iedaļas pēdējo rindkopu). Negaistošām testējamajām vielām, kas nav iezīmētas ar radioaktīvajiem izotopiem, gāzi necaurlaidīgi aizbāžņi vai vāciņi nav vajadzīgi, un ir piemēroti vaļīgi vates aizbāžņi, kas novērš piesārņošanos no gaisa (sk. 1.8.9.1. iedaļas otro rindkopu). Maz gaistošas vielas jātestē biometra tipa sistēmā, uzmanīgi maisot ūdens virsmu. Lai būtu droši, ka nenotiek bakteriālā piesārņošanās, traukus pirms lietošanas var sterilizēt karsējot vai apstrādājot autoklāvā. Turklāt tiek izmantots šāds standarta laboratorijas aprīkojums:

— kratītājs vai magnētiskie maisītāji testa kolbu nepārtrauktai maisīšanai,

▼M1

— centrifūga,

— pH metrs,

— turbidimetrs nefelometriskiem duļķainības mērījumiem,

— žāvējamais skapis vai mikroviļņu krāsns sausnas masas noteikšanai,

— membrānfiltrācijas aparāts,

— autoklāvs vai skapis stikla trauku termiskai sterilizēšanai,

— ierīces darbam ar ^{14}C iezīmētām vielām,

— aprīkojums ^{14}C aktivitātes kvantitatīvai noteikšanai CO_2 absorbcijas šķīdumu paraugos un vajadzības gadījumā sedimentu paraugos,

— analītiskais aprīkojums testējamās vielas (un standartvielas) noteikšanai, ja izmanto specifisku ķīmisko analīzi (piemēram, gāzu hromatogrāfu, augstspiediena šķidruma hromatogrāfu).

1.8.2. **Testējamās vielas izejas standartšķīdums**

Testējamās vielas un standartvielas izejas standartšķīdumu gatavošanai izmanto dejonizētu ūdeni (sk. 1.8.7. iedaļas pirmo rindkopu). Dejonizētajā ūdenī nedrīkst būt mikroorganismiem toksisku vielu, un izšķīdušajam organiskajam ogleklim (*DOC*) jābūt ne vairāk par 1 mg/l (6).

1.8.3. **Virszemes ūdens paraugu ņemšana un transportēšana**

Paraugu ņemšanas vieta virszemes ūdens savākšanai katrā konkrētajā situācijā jāizraugās atbilstoši testēšanas nolūkam. Izraugoties paraugu ņemšanas vietas, jāņem vērā iespējamo lauksaimniecības, rūpniecības vai mājsaimniecības vielu ievadīšanas vēsture. Ja zināms, ka ūdens vide iepriekšējo četru gadu laikā ir piesārņota ar testējamo vielu vai tās struktūras analogiem, testējamā ūdens paraugus no tās neņem, izņemot gadījumus, kad izpētes mērķis ir noskaidrot noārdīšanās ātrumu tās iedarbībai pakļautajās vietās. Parauga ņemšanas laikā jāizmēra ūdens pH un temperatūra. Turklāt ir jāatzīmē paraugu ņemšanas dziļums un ūdens paraugu izskats (piemēram, krāsa un duļķainība) (sk. 3. iedaļu). Lai parādītu, ka apstākļi ir aerobi – ja vien tas nav acīmredzami, spriežot pēc ārējām pazīmēm un vietas vēstures, jāmēra skābekļa koncentrācija un/vai redokspotenciāls ūdenī un nosēdumu virsmas slānī. Virszemes ūdens jātransportē pilnīgi tīrā konteinerā. Parauga temperatūra transportēšanas laikā nedrīkst ievērojami pārsniegt temperatūru testēšanas laikā. Ja transportēšanas laiks ir ilgāks par 2 līdz 3 stundām, ūdens paraugu ieteicams atdzesēt līdz 4 ^{o}C temperatūrai. Ūdens paraugu nedrīkst sasaldēt.

▼M1

1.8.4. **Virszemes ūdensparaugu glabāšana un sagatavošana testēšanai**

Testēšanu vēlams sākt vienas dienas laikā pēc paraugu ņemšanas. Ja paraugi jāglabā, glabāšanas laikam jābūt iespējami īsam, un tas nedrīkst pārsniegt 4 nedēļas. Līdz lietošanai ūdens paraugs jāglabā 4 °C temperatūrā aerējot. Pirms izmantošanas jāatdala rupjās daļiņas, piemēram, filtrējot caur neilona filtru ar aptuveni 100 μm acu izmēru vai caur rupju papīra filtru, vai nostādinot.

1.8.5. **Ar sedimentiem papildināta ūdens sagatavošana (neobligāti)**

Suspendēto sedimentu testam kolbās, kas satur dabīgo ūdeni (filtrētu, lai atdalītu rupjās daļiņas, kā aprakstīts 1.8.4. iedaļā), pievieno sedimenta virskārtu suspensijas iegūšanai; suspendēto cieto vielu koncentrācijai jābūt no 0,01 līdz 1 g/l. Sedimenta virskārtu ņem no tās pašas vietas, kur ņemts ūdens paraugs. Atkarībā no konkrētās ūdens vides sedimentiem var būt raksturīgs liels organiskā oglekļa saturs (2,5–7,5 %) un smalka tekstūra vai mazs organiskā oglekļa saturs (0,5–2,5 %) un rupja tekstūra (3). Sedimenta virskārtas paraugu var sagatavot šādi: lietojot caurspīdīgu plastmasa cauruli, izņem vairākus sedimenta griezumus, nekavējoties atdala augšējos aerobos slāņus (no virsmas līdz maksimāli 5 mm dziļumam) un tos apvieno. Tādā veidā izveidotais apvienotais sedimentu paraugs jātransportē konteinerā ar plašu gaisa telpu, lai sedimentus uzglabātu aerobos apstākļos (atdzesēt līdz 4 °C, ja transportēšanas ilgums pārsniedz 2–3 stundas). Sedimentu paraugs jāsuspendē testa ūdenī attiecībā 1:10 un līdz lietošanai jāglabā 4 °C temperatūrā aerējot. Ja sedimenti jāglabā, glabāšanas laikam jābūt iespējami īsam, un tas nedrīkst pārsniegt 4 nedēļas.

1.8.6. **Pusnepārtrauktā procedūra (neobligāti)**

Ilgstoša inkubēšana (vairākus mēnešus) var būt nepieciešama, ja, pirms var izmērīt testējamās vielas ievērojamu noārdīšanos, ir ilgs kavēšanās laiks. Ja tas ir zināms no vielas līdzšinējās testēšanas pieredzes, testu var sākt, izmantojot pusnepārtraukto procedūru, kas ļauj periodiski atjaunot daļu testējamā ūdens prauga vai suspensijas (sk. 2. pielikumu). Parasto sēriju testu var pārveidot par pusnepārtraukto testu, ja, izmantojot sēriju procedūru, aptuveni 60 dienu laikā nav novērojama vielas bioloģiskā noārdīšanās (sk. 1.8.8.3. iedaļas otro rindkopu).

1.8.7. **Testējamās vielas (vai standartvielas) pievienošana**

Vielām, kas labi šķīst ūdenī (> 1 mg/l) un ir maz gaistošas (Henrija konstantes < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ jeb < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), izejas standartšķīdumu var sagatavot dejonizētā ūdenī (sk 1.8.2. iedaļu); lai sasniegtu vajadzīgo koncentrāciju, atbilstošu izejas standartšķīduma tilpumu pievieno testa traukos. Pievienotais izejas standartšķīduma tilpums nedrīkst pārsniegt praktisko minimumu (ja iespējams, < 10 % no galīgā šķidruma tilpuma). Par organisko šķīdinātāju lietošanas alternatīvu var uzskatīt arī testējamās vielas šķīdināšanu lielākā testa ūdens tilpumā.

▼M1

Negaistošu vielu ar mazu šķīdību ūdenī izejas standartšķīdumi jāgatavo, izmantojot organisku šķīdinātāju, ja no tā nevar izvairīties, bet testējamai sistēmai pievienotā šķīdinātāja daudzums nedrīkst pārsniegt 1 % tilp., un tas nedrīkst nevēlami ietekmēt mikrobu aktivitāti. Šķīdinātājs nedrīkst ietekmēt testējamās vielas stabilitāti ūdenī. Šķīdinātājs jālieto niecīgā daudzumā, tā, lai tas ievērojami nepalielinātu testa ūdens vai suspensijas izšķīdušā organiskā oglekļa (*DOC*) koncentrāciju. Tas jāpārbauda ar vielai specifisku analīzi vai, ja iespējams, *DOC* analīzi (6). Jāraugās, lai pārnestā šķīdinātāja daudzums nepārsniegtu absolūti nepieciešamo, un testējamās vielas daudzums izšķīstu testa ūdens galīgajā tilpumā. Var izmantot citas metodes testējamās vielas ievadīšanai testa traukos, kā aprakstīts (7) un (8). Ja testējamās vielas pievienošanai izmanto organisko šķīdinātāju, tad līdzīgi kā ar aktīvā testa traukiem, kuros pievienota testa viela ar šķīdinātāju kā nesēju, ir jārīkojas ar kontroles traukiem, kas satur testa ūdeni (bez pievienotām vielu piedevām) un testa ūdeni ar pievienotu standartvielu. Šķīdinātāja kontrole vajadzīga, lai konstatētu iespējamo šķidinātāja nevēlamo iedarbību uz mikrobu populāciju, par ko liecina standartvielas noārdīšanās.

1.8.8. **Testēšanas apstākļi**

1.8.8.1. *Testēšanas temperatūra*

Inkubācijai jānotiek tumsā (vēlams) vai izkliedētā apgaismojumā temperatūrā, ko uztur ar precizitāti ± 2 °C, un var būt apkārtējā temperatūra vai standarta temperatūra 20–25 °C. Apkārtējā temperatūra var būt parauga faktiskā temperatūra parauga ņemšanas laikā vai vidējā temperatūra parauga ņemšanas vietā.

1.8.8.2. *Maisīšana*

Maisīšana ar nepārtrauktu kratīšanu vai maisīšanu jāveic, lai daļiņas un mikroorganismi visu laiku būtu suspensijā. Maisīšana arī atvieglo skābekļa pārnesi no virsējās tukšās telpas šķidrumā tā, lai varētu uzturēt aerobus apstākļus. Kolbas novieto kratītājā (aptuveni 100 apgr./min kratīšana) vai izmanto magnētisko maisītāju. Maisīšanai jābūt nepārtrauktai. Kratīšanai vai maisīšanai jābūt iespējami saudzīgai, kas tomēr saglabā homogēnu suspensiju.

1.8.8.3. *Testēšanas ilgums*

Testēšanas laiks parasti nedrīkst pārsniegt 60 dienas, ja neizmanto pusnepārtraukto procedūru ar testa suspensijas periodisku atjaunošanu (sk. 1.8.6. iedaļu un 2. pielikumu). Tomēr testēšanas ilgumu sēriju testā var paildzināt maksimāli līdz 90 dienām, ja testējamās vielas noārdīšanās ir sākusies pirmo 60 dienu laikā. Noārdīšanos piemērotos laika intervālos kontrolē, nosakot atlikušā ^{14}C aktivitāti vai izdalījušos $^{14}CO_2$ (sk. 1.8.9.4. iedaļu) un/vai ar ķīmisko analīzi (1.8.9.5. iedaļa). Lai novērtētu noārdīšanās procesu, inkubācijas laikam jābūt pietiekami ilgam. Vēlams, lai noārdīšanās pakāpe būtu lielāka par 50 %; vielām, kas noārdās lēni, noārdīšanās pakāpei jābūt pietiekami lielai (parasti lielākai par 20 %), lai varētu noteikt noārdīšanās kinētiskā ātruma konstanti.

▼M1

Jāveic regulāri pH un skābekļa koncentrācijas mērījumi, izņemot gadījumus, kad pieredze ar tajā pašā vietā ņemtiem ūdens un nosēdumu paraugiem liecina, ka šādi mērījumi nav vajadzīgi. Dažkārt primāro substrātu metabolisms daudz lielākās koncentrācijās ar ūdeni un nosēdumiem var izraisīt pietiekamu CO_2 veidošanos un skābekļa patēriņu, kas ievērojami atšķiras no eksperimenta apstākļiem testēšanas laikā.

1.8.9. **Procedūra**

1.8.9.1. *Kolbu sagatavošana pelaģiskajam testam*

Piemērotu testa ūdens tilpumu pārnes testa kolbās apmēram līdz vienai trešdaļai no kolbas tilpuma, bet ne mazāk par 100 ml. Ja izmanto vairākas kolbas (lai varētu izmantot visas kolbas saturu katrā parauga ņemšanas laikā), piemērotākais testa ūdens tilpums arī ir ap 100 ml, jo mazi paraugu tilpumi var ietekmēt kavēšanās fāzes ilgumu. Testējamo vielu pievieno no izejas standartšķīduma, kā aprakstīts 1.8.2. un 1.8.7. iedaļā. Lai noteiktu noārdīšanās kinētiku un aprēķinātu noārdīšanās kinētisko ātruma konstanti, jāizmanto vismaz divas testējamās vielas koncentrācijas, kas atšķiras 5 līdz 10 reizes. Abām izraudzītajām koncentrācijām jābūt mazākām par 100 μg/l un vēlams diapazonā < 1–10 μg/l.

Kolbas noslēdz ar gaisu un CO_2 necaurlaidīgiem aizbāžņiem vai vāciņiem. Ar ^{14}C neiezīmētām negaistošām testa vielām ieteicams izmantot vaļīgus vates aizbāžņus, kas novērš piesārņošanos no gaisa (sk. 1.8.1. iedaļu), ja galvenie noārdīšanās produkti ir negaistoši un CO_2 nosaka netieši (sk. 3. pielikumu).

Kolbas inkubē izraudzītajā temperatūrā (sk. 1.8.8.1. iedaļu). Paraugus ķīmiskajai analīzei vai ^{14}C mērījumiem ņem testēšanas sākumā (t. i., pirms sākusies bioloģiskā noārdīšanās, sk. 1.7.1. iedaļu) un pēc tam piemērotos laika intervālos testēšanas laikā. Paraugus var ņemt, ņemot apakšparaugus (piemēram, 5 ml alikvotas) no katra atkārtojuma, vai izmantojot visas kolbas saturu katrā parauga ņemšanas reizē. Testa vielas mineralizāciju var noteikt tieši vai netieši (sk. 3. pielikumu). Parasti noārdīšanās fāzes laikā (t. i., pēc kavēšanās fāzes) ir vajadzīgi vismaz pieci paraugu ņemšanas punkti, lai ticami noteiktu ātruma konstanti, ja vien nav ietiekama pamatojuma uzskatīt, ka trīs paraugu ņemšanas punkti ir pietiekami vielām, kuras ātri noārdās. Vielām, kas nenoārdās ātri, noārdīšanās fāzē viegli var izdarīt vairākus mērījumus, un tāpēc konstantes noteikšanai jāizmanto vairāk datu punktu. Paraugu ņemšanai fiksētu grafiku nevar noteikt, jo bioloģiskās noārdīšanās ātrums ir katrai vielai atšķirīgs, tomēr ieteicams ņemt paraugus reizi nedēļā, ja noārdīšanās notiek lēni. Ja testējamā viela noārdās ātri, paraugi jāņem trīs dienas pēc kārtas vienreiz dienā, un pēc tam katru otro vai trešo dienu. Dažos gadījumos, piemēram, ar vielām, kas ļoti ātri hidrolizējas, paraugi var būt jāņem ar dažu stundu intervālu. Pirms testēšanas ieteicams veikt orientējošu pētījumu, lai noteiktu piemērotākos paraugu ņemšanas intervālus. Ja paraugi nepieciešami turpmākām analīzēm, ieteicams ņemt vairāk paraugu un pēc tam izvēlēties tos, kas analizējami eksperimenta beigās saskaņā ar atpakaļgaitas stratēģiju, t. i., pēdējos paraugus analizē vispirms (sk. norādījumus par paraugu stabilitāti glabāšanas laikā 1.8.9.5. iedaļas otrajā rindkopā).

▼**M1**

1.8.9.2. *Kolbu un paraugu skaits*

Nokomplektē pietiekamu testa kolbu skaitu, lai būtu:

— testa kolbas, katrai testējamās vielas koncentrācijai vismaz divos atkārtojumos (vēlams vismaz 3), vai vairāk, ja katrā paraugu ņemšanas reizē izmanto visu kolbas saturu (apzīmē ar F_T),

— testa kolbas masas bilances aprēķināšanai katrai testa vielas koncentrācijai vismaz divas kolbas (apzīmē ar F_M),

— tukšais mēģinājums bez testējamās vielas, vismaz viena testa kolba, kura satur tikai testa ūdeni (apzīmē ar F_B),

— standartvielas kontroles mēģinājums; divas kolbas ar standartvielu (piemēram, anilīnu vai nātrija benzoātu 10 μg/l) (apzīmē ar F_C). Standartvielas kontroles nolūks ir apstiprināt mikrobu aktivitātes minimumu. Ja iespējams, var izmantot ar radioaktīvo izotopu iezīmētu standartvielu arī tad, ja testējamās vielas noārdīšanos kontrolē ar ķīmiskajām analīzēm,

— sterilā kontrole; viena vai divas kolbas, kas satur sterilizētu testa ūdeni, lai konstatētu iespējamu abiotisku noārdīšanos vai citādu ar bioloģiskiem procesiem nesaistītu testējamās vielas izmantošanu (apzīmē ar F_S). Bioloģisko aktivitāti var apturēt, testa ūdeni sterilizējot autoklāvā (121 °C; 20 min) vai pievienojot toksisku vielu (piemēram, nātrija azīdu (NaN_3) 10–20 g/l, dzīvsudraba hlorīdu ($HgCl_2$) 100 mg/l vai formalīnu 100 mg/l), vai apstarojot ar gamma stariem. Ja izmanto $HgCl_2$, tas testa ūdens jālikvidē kā toksiskie atkritumi. Ūdenim ar lielu pievienoto sedimenta daudzumu sterilitāti panākt nav viegli, tādā gadījumā ieteicama atkārtota apstrāde autoklāvā (piemēram, trīs reizes). Jāņem vērā, ka sterilizācija autoklāvā var mainīt sedimentu sorbcijas īpašības,

— šķīdinātāja kontrole; satur testa ūdeni un testa ūdeni ar standartvielu; divas kolbas, ar to pašu šķīdinātāja daudzumu un izmantojot to pašu procedūru kā testējamajai vielai. Nolūks ir konstatēt iespējamo nevēlamo šķīdinātāja ietekmi, nosakot standartvielas noārdīšanos.

Testēšanas plānā jāņem vērā, vai svarīgāk palielināt atkārtojumu skaitu, vai arī ņemšanas laiku skaitu. Precīzs vajadzīgo kolbu skaits ir atkarīgs no noārdīšanās mērījumiem izmantojamās metodes (sk. 1.8.9.1. iedaļas trešo rindkopu, 1.8.9.4. iedaļu un 3. pielikumu).

▼M1

No katras kolbas katrā paraugu ņemšanas laikā jāņem divi apakšparaugi (piemēram, 5 ml alikvotas). Ja vienam variantam izmanto vairākas kolbas, lai varētu izmantot visu kolbas saturu, katram paraugu ņemšanas laikam jāizmanto vismaz divas kolbas (sk. 1.8.9.1. iedaļas pirmo rindkopu).

1.8.9.3. *Kolbu sagatavošana suspendēto nosēdumu testam [neobligāti]*

Iepilda vajadzīgos testa ūdens un, ja vajadzīgs, sedimentu tilpumus testa traukos (sk. 1.8.5. iedaļu). Kolbu sagatavošana suspendēto sedimentu testam ir tāda pati kā pelaģiskajam testam (sk. 1.8.9.1. un 1.8.9.2. iedaļu). Izmanto, vēlams, seruma pudeles vai līdzīgas formas kolbas. Noslēgtas kolbas horizontāli novieto uz kratītāja platformas. Acīmredzot, atvērtas kolbas ar ^{14}C neiezīmētām negaistošām vielām ir jānovieto vertikāli, tādā gadījumā ieteicams izmantot magnētisko maisītāju un magnētiskos stienīšus ar stikla pārklājumu. Aerobus apstākļu nodrošināšanai veic pudeļu satura aerāciju.

1.8.9.4. *Radioķīmiskās noteikšanas metodes*

Izdalījušos $^{14}CO_2$ daudzumu nosaka tiešos vai netiešos mērījumos (sk. 3. pielikumu). Netieši $^{14}CO_2$ nosaka pēc starpības starp sākotnējo ^{14}C aktivitāti testa ūdenī vai suspensijā un kopējo atlikuma aktivitāti parauga ņemšanas laikā, mērot pēc parauga paskābināšanas līdz pH 2–3 un CO_2 izdalīšanas. Tādā veidā tiek aizvadīts neorganiskais ogleklis, un izmērītā atlikuma aktivitāte attiecināma uz organisko vielu. Netiešu $^{14}CO_2$ noteikšanu neizmanto, ja testējamās vielas noārdīšanās laikā radušies svarīgākie pārveidošanās produkti ir gaistoši (sk. 3. pielikumu). Ja iespējams, $^{14}CO_2$ izdalīšanās jāmēra tieši (sk. 3. pielikumu) katrā paraugu ņemšanas laikā vismaz vienā testa kolbā; šī procedūra rada iespējas kontrolēt gan masas bilanci, gan bioloģiskās noārdīšanās procesu, taču metodi var izmantot tikai testiem, ko veic ar noslēgtām kolbām.

Ja radušos $^{14}CO_2$ mēra tieši testa laikā, šajā nolūkā testa sākumā jāsagatavo vairāk kolbu. Tiešu $^{14}CO_2$ noteikšanu veikt ir ieteicams, ja testējamās vielas pārveidošanās laikā radušies svarīgākie pārveidošanās produkti ir gaistoši. Katrā mērījumu punktā testa papildu kolbas paskābina līdz pH 2–3 un $^{14}CO_2$ uztver iekšējā vai ārējā absorberā (sk. 3. pielikumu).

Pēc izvēles ar ^{14}C izotopu iezīmētu testējamo vielu un to galveno pārveidošanās produktu koncentrāciju var noteikt ar radiohromatogrāfiju (piemēram, plānslāņa hromatogrāfiju, RAD-TLC) vai HPLC ar radioķīmisko detektēšanu.

Pēc izvēles var noteikt atlikuma radioaktivitātes fāzu sadalījumu (sk. 1. pielikumu), un testējamās vielas nesadalījušos atlikumu vai tās pārveidošanās produktus.

▼M1

Testēšanas beigās tiešos $^{14}CO_2$ mērījumos nosaka masas bilanci, izmantojot atsevišķas testa kolbas, no kurām testēšanas laikā netika ņemti paraugi (sk. 3. pielikumu).

1.8.9.5. *Ķīmisko analīžu metodes*

Ja ir iespējams izmantot jutīgu analīzes metodi, primāro bioloģisko noārdīšanos var novērtēt, izmērot testējamās vielas atlikuma kopējo koncentrāciju bez iezīmēšanas a radioaktīvo izotopu. Ja izmanto ar radioaktīvu izotopu iezīmētu testējamo vielu (lai noteiktu kopējo mineralizāciju), paralēli var izdarīt specifisku ķīmisko analīzi, lai sniegtu noderīgu papildu informāciju un kontrolētu procedūru. Specifiskas ķīmiskās analīzes var izmantot arī, lai mērītu pārveidošanās produktus, kas veidojas testa vielas noārdīšanās laikā, un tas ir ieteicams vielām, kuru mineralizēšanās pusperiods ir lielāks par 60 dienām. Katram parauga ņemšanas laikam jāmēra un jāreģistrē testējamās vielas un pārveidošanās produktu koncentrācija (koncentrācijas veidā un kā procentuālais daudzums no lietotās). Vispār ir jāidentificē pārveidošanās produkti, kas ir detektēti pie ≥ 10 % no lietotās koncentrācijas katrā parauga ņemšanas reizē, ja nav pienācīgi pamatots citādi. Jāapsver arī tādu pārveidošanās produktu identifikācijas nepieciešamība, kuru koncentrācija pastāvīgi palielinās, pat ja to koncentrācija nepārsniedz iepriekš norādīto robežu, jo tas var norādīt uz noturīgumu. Jāapsver pārveidošanās produktu analizēšanas nepieciešamība sterilajā kontrolē ja uzskata, ka iespējama testējamās vielas ātra abiotiska pārveidošanās (piemēram, hidrolīze). Vajadzība identificēt un kvantitatīvi noteikt pārveidošanās produktus jāapsver, katru gadījumu izskatot atsevišķi, un tās pamatojumu sniedzot testēšanas pārskatā. Ekstrakcijas metodes ar organisku šķīdinātāju jāizmanto saskaņā ar attiecīgās analītiskās procedūras aprakstā sniegtajiem norādījumiem.

Visi paraugi jāglabā 2–4 °C temperatūrā un bez gaisa piekļuves, ja analīzi veic 24 stundu laikā (vēlams). Ilgākai glabāšanai paraugi ir jāsasaldē zem – 18 °C vai ķīmiski jākonservē. Paraugu konservēšanai paskābināšana nav ieteicama, jo paskābināti paraugi var būt nestabili. Ja paraugus neanalizē 24 stundu laikā un tie tiek glabāti ilgāk, ir jāveic pētījums par stabilitāti glabājot, lai parādītu, ka nosakāmā viela, glabājot – 18 °C temperatūrā vai konservēšanas apstākļos ir stabila. Ja analītiskajā metodē ietilpst ekstrakcija ar šķīdinātāju vai cietās fāzes ekstrakciju (CFE), ekstrakcija jāveic tūlīt pēc paraugu ņemšanas vai pēc glabāšanas vēsumā ne ilgāk par 24 stundām.

Atkarībā no analītiskās metodes jutības var būt vajadzīgi lielāki parauga tilpumi nekā norādīts 1.8.1. iedaļā. Testēšana ērti izdarāma ar viena litra paraugiem 2–3 litru tilpuma kolbās, kas dod iespējas analīzēm ņemt apmēram 100 ml tilpuma paraugus.

▼M1

2. **DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

2.1.1. **Datu atlikšana**

Paraugu ņemšanas laiku noapaļo līdz veselām stundām (ja vien viela ievērojami nenoārdās minūšu līdz dažu stundu laikā), bet nevis līdz veselam skaitam dienu. Testējamās vielas atlikuma aktivitāti (ar ^{14}C iezīmētām vielām) vai atlikuma koncentrāciju (neiezīmētām vielām) atkarībā no laika atliek uz grafika lineārās un puslogaritmiskās koordinātēs (sk. 1.a, 1.b attēlu). Ja ir notikusi noārdīšanās, salīdzina rezultātus no kolbām F_T ar rezultātiem no kolbām F_S. Ja rezultātu vidējie lielumi no kolbām ar testējamo vielu (F_T) un no sterilajām kolbām (F_S) atšķiras mazāk par 10 %, var pieņemt, ka novērotā noārdīšanās galvenokārt ir abiotiska. Ja noārdīšanās kolbās F_S ir mazāka, skaitļus var izmantot, lai koriģētu tos, kas iegūti ar kolbām F_T (atņemot) novērtētu bioloģiskās noārdīšanās pakāpi. Ja veic svarīgāko pārveidošanās produktu analīzes, to veidošanās un samazināšanās grafiki ir jāsniedz papildus testējamās vielas daudzuma samazināšanās grafikam.

Pēc noārdīšanās līknes (puslogaritmiskais grafiks) nosaka kavēšanās fāzes ilgumu t_L, ekstrapolējot tās lineāro daļu uz nulles noārdīšanos vai nosakot laiku, kurā noārdījušies aptuveni 10 % vielas (sk. 1.a un 1.b att.). No puslogaritmiskā grafika novērtē pirmās kārtas ātruma konstanti k un tās standartkļūdu pēc naturālā logaritma ln lineārās regresijas (^{14}C atlikuma aktivitātei vai testa vielas atlikuma koncentrācijai) atkarībā no laika. Jo īpaši ar ^{14}C mērījumiem izmanto tikai datus, kas piederīgi līknes sākotnējai lineārajai daļai pēc kavēšanās fāzes beigām, un dod priekšroku dažu reprezentatīvu datu izvēlei, nevis lielāka skaita mazāk drošu datu izvēlei. Nenoteiktība šajā gadījumā iekļauj kļūdas, kas piemīt ieteicamajai izmērīto ^{14}C atlikuma aktivitāšu izmantošanai (sk. turpmāk). Dažkārt var būt jāaprēķina divas dažādas ātruma konstantes, ja noārdīšanās notiek divās fāzēs. Šajā nolūkā definē divas atšķirīgas noārdīšanās līknes fāzes. Ātruma konstanti k un pussadalīšanās periodu $t_{½}$ = ln2/k aprēķina katram atkārtojumam, ja apakšparaugus ņem no vienas kolbas, vai izmantojot vidējās vērtības, ja katrā parauga ņemšanas laikā izmanto visu vienas kolbas saturu (sk. 1.8.9.2. iedaļas pēdējo rindkopu). Pirmajā gadījumā ātruma konstante un pussadalīšanās periods jānorāda katram atkārtojumam atsevišķi, to vidējā vērtība ar standartkļūdu. Ja ir izmantotas lielas testējamās vielas koncentrācijas, noārdīšanās līkne var ievērojami atšķirties no taisnes (puslogaritmiskais grafiks), un pirmās kārtas kinētika var nebūt spēkā. Tāpēc nav nozīmes noteikt pussadalīšanās periodu. Tomēr ierobežotā datu diapazonā var izmantot pseidopirmās kārtas kinētiku un noteikt pusnoārdīšanās laiku DT_{50} (laiku, kurā sasniedz 50 % noārdīšanos). Tomēr jāievēro, ka noārdīšanās gaitu ārpus izraudzītajam datu diapazonam pēc DT_{50} nevar prognozēt, un ka apraksta tikai konkrēto datu kopumu. Pieejamas datu analīzes metodes statistikas aprēķinu veikšanai un līknes aproksimācijai, un šim nolūkam ieteicams izmantot minētā veida programmatūru.

▼M1

Ja veic specifiskas ķīmiskās analīzes, primārās noārdīšanās ātruma konstantes un pussadalīšanās periodus nosaka kopējai mineralizācijai, kā norādīts iepriekš. Ja limitējošais process ir primārā noārdīšanās, var izmantot datu punktus no visas noārdīšanās gaitas. Tā tas ir tāpēc, ka mērījumi ir tieši, pretstatā ^{14}C aktivitātes mērījumiem.

Ja izmanto ar ^{14}C izotopu iezīmētas vielas, masas bilanci izsaka procentos no lietotās sākotnējās koncentrācijas vismaz testa beigās.

2.1.2. **Atlikuma aktivitāte**

Ja noārdās ar ^{14}C iezīmētā organiskās vielas daļa, lielākā ^{14}C daļa pārvēršas par $^{14}CO_2$, bet otra daļa tiek izmantota biomasas pieaugumam un/vai ārpusšūnu metabolītu sintēzei. Tāpēc pilnīgā "galīgā" vielas bioloģiskā noārdīšanās nenotiek tās oglekļa 100 % pārvēršanās par $^{14}CO_2$. Biosintēzes produktos saistītais ^{14}C turpmāk lēni izdalās $^{14}CO_2$ veidā "sekundārās mineralizācijas" dēļ. Šo iemeslu dēļ organiskā ^{14}C atlikuma aktivitātes (mērītas pēc CO_2 izdalīšanās) vai $^{14}CO_2$ atlikuma aktivitāte atkarībā no laika, uzrāda "astes" pēc noārdīšanās beigām. Tas apgrūtina kinētikas interpretāciju, un tāpēc noārdīšanās ātruma konstantes noteikšanai parasti izmanto tikai līknes sākuma daļu (pēc kavēšanās fāzes beigām un pirms ir sasniegta apm. 50 % noārdīšanās). Noārdīšanās procesa laikā kopējā atlikuma organiskā ^{14}C aktivitāte vienmēr ir lielāka par ^{14}C aktivitāti, kas saistīta ar vēl nenoārdījušos testējamo vielu. Ja testējamās vielas noārdīšanās notiek pēc pirmās kārtas reakcijas mehānisma un konstanta daļa α mineralizējas par CO_2, ^{14}C noārdīšanās līknes sākotnējais virziena koeficients – slīpums (kopējā organiskā ^{14}C attiecība pret laiku) ir α reizinājums ar atbilstošās testējamās vielas (vai precīzāk ar ^{14}C iezīmētās testējamās vielas daļas) koncentrācijas līknes virziena koeficientu. Ja izmanto nekoriģētus kopējās organiskā ^{14}C aktivitātes mērījumus, aprēķinātā sadalīšanās ātruma konstante tāpēc būs konservatīvs lielums. Literatūrā aprakstītas procedūras testējamās vielas koncentrācijas aprēķināšanai pēc izmērītām radioķīmiskām aktivitātēm, pamatojoties uz dažādiem vienkāršojošiem pieņēmumiem (2)(9)(10)(11). Tādas procedūras vienkāršāk izmantojamas vielām, kas ātri noārdās.

2.2. REZULTĀTU INTERPRETĀCIJA

Ja tiek konstatēts, ka k nav atkarīga no pievienotās koncentrācijas (t. i., ja aprēķinātā k vērtība ir aptuveni vienāda pie dažādām testējamās vielas koncentrācijām), var pieņemt, ka izmantotajiem testēšanas apstākļiem, t. i., testējamajai vielai, ūdens paraugam un testa temperatūrai, reprezentatīva ir pirmās kārtas reakcijas ātruma konstante. Ciktāl rezultātus var vispārināt vai ekstrapolēt uz citām sistēmām, ir jānovērtē eksperta slēdzienā. Ja izmanto lielu testējamās vielas koncentrāciju un tāpēc noārdīšanās nenotiek atbilstoši pirmās kārtas kinētikai, datus nevar izmantot pirmās kārtas reakcijas ātruma konstantes vai atbilstošā pussadalīšanās perioda tiešai aprēķināšanai. Tomēr datus, kas iegūti testā ar augstu testējamās vielas koncentrāciju, var izmantot, lai novērtētu kopējo mineralizācijas pakāpi un/vai identificētu un kvantitatīvi noteiktu pārveidošanās produktus.

▼M1

Ja ir zināmi citu noārdīšanās procesu ātrumi, kas nav bioloģiskā noārdīšanās, (piemēram, hidrolīzes vai iztvaikošanas) ātrumi, aptuvenai bioloģiskās noārdīšanās ātruma aprēķināšanai tos var atņemt no testa laikā novērotā kopējā noārdīšanās ātruma. Hidrolīzes datus var, piemēram, iegūt no sterilās kontroles vai no paralēla testa, kurā izmanto lielāku testējamās vielas koncentrāciju.

Netiešo un tiešo $^{14}CO_2$ noteikšanu (1.8.9.4. iedaļa un 3. pielikums) var izmantot tikai, lai izmērītu testa vielas mineralizāciju līdz CO_2. Radiohromatogrāfiju (RAD-TLC) vai HPLC var izmantot, lai analizētu ar ^{14}C iezīmētas testa vielas koncentrāciju un galveno pārveidošanās produktu veidošanos (1.8.9.4. iedaļas trešā rindkopa). Lai varētu tieši novērtēt pussadalīšanās periodu, ir nepieciešams, lai klāt nebūtu svarīgākie pārveidošanās produkti (definēti kā ≥ 10 % no pievienotās testējamās vielas daudzuma). Ja tā definētie galvenie pārveidošanās produkti ir klāt, nepieciešams sīks datu novērtējums. Šim nolūkam var veikt atkārtotu testēšanu un/vai pārveidošanās produktu identificēšanu (sk. 1.8.9.5. iedaļas pirmo rindkopu), ja vien pārveidošanās produktu rezultātu nevar pamatoti novērtēt no pieredzes (piemēram, no informācijas par noārdīšanās ceļiem). Tā kā testējamās vielas oglekļa daļa, kas pārvēršas par CO_2, mainās (galvenokārt atkarībā no testējamās vielas koncentrācijas un citiem pieejamiem substrātiem, testēšanas apstākļiem un mikroorganismu kopuma), šis tests neļauj tieši novērtēt galīgo bioloģisko noārdīšanos, kā tas ir *DOC* izzušanas testā, bet rezultāts ir līdzīgs respirometrijas testā iegūtajam rezultātam. Mineralizācijas pakāpe tāpēc ir mazāka vai vienāda ar galīgās bioloģiskās noārdīšanās minimālo līmeni. Lai iegūtu pilnīgāku ainu par galīgo bioloģisko noārdīšanos (mineralizāciju un izmantošanu biomasas veidošanai), testa beigās jāveic ^{14}C fāzu sadalījuma analīze (sk. 1. pielikumu). Cieto daļiņu masā esošais ^{14}C daudzums sastāv no baktēriju biomasā ietvertā ^{14}C, un no ^{14}C, ko ir sorbējušas organiskās daļiņas.

2.3. TESTĒŠANAS METODES VALIDĀCIJA

Ja standartviela sagaidāmajā laika intervālā nenoārdās (anilīns un nātrija benzoāts parasti noārdās mazāk nekā divās nedēļās), iegūtie testēšanas rezultāti ir apšaubāmi, un tie ir jāverificē vai testēšana jāatkārto ar jaunu ūdens paraugu. Pēc ISO metodes veiktā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, kurā piedalījās septiņas Eiropas laboratorijas, noteiktās koriģētās anilīna noārdīšanās ātruma konstantes bija diapazonā no 0,3 līdz 1,7 dienas^{-1} ar vidējo vērtību 0,8 d^{-1} 20 °C temperatūrā un ar standartkļūdu ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dienas). Parastie kavēšanās laiki bija 1 līdz 7 dienas. Analizētajos ūdens paraugos baktēriju biomasas daudzums atbilda 10^3-10^4 kolonijas veidojošām vienībām (KVV) vienā mililitrā. Noārdīšanās ātrumi ar barības vielām bagātos Eiropas vidienes ūdeņos bija lielāki nekā Ziemeļu oligotrofajos ūdeņos, kas varētu būt izskaidrojams ar trofiskā režīma atšķirībām vai ar vielu iepriekšēju iedarbību.

Kopējai atgūstamībai (masas bilancei) testa beigās jābūt no 90 % līdz 110 % ar radioaktīvo izotopu iezīmētām vielām, bet neiezīmēto vielu sākotnējai atgūstamībai eksperimenta sākumā jābūt no 70 % līdz 110 %. Tomēr norādītie diapazoni jāinterpretē tikai kā mērķa vērtības, un tie nav jāizmanto par testēšanas rezultātu pieņemamības kritērijiem.

▼M1

3. **TESTĒŠANAS PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā skaidri jānorāda testēšanas paņēmiens, t. i., pelaģiskais vai suspendētu sedimentu tests, un testēšanas pārskatā jābūt arī vismaz šādai informācijai.

Testējamās vielas un standartvielas:

— vispārējie nosaukumi, ķīmiskie nosaukumi (ieteicams izmantot IUPAC un/vai *CAS* nosaukumu), *CAS* numuri, struktūrformulas (norādot ^{14}C vietu, ja izmanto ar radioaktīvo izotopu iezīmētu vielu), un testējamās vielas un standartvielas attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības (sk. 1.5. un 1.6. iedaļu),

— ķīmiskie nosaukumi, *CAS* numuri, struktūrformulas (norādot ^{14}C vietu, ja izmanto radioaktīvi iezīmētu vielu) un attiecīgās fizikāli ķīmiskās īpašības vielām, ko izmanto par standartiem pārveidošanās produktu identificēšanai un kvantitatīvai noteikšanai,

— testējamās vielas un standartvielu tīrība (piemaisījumi),

— iezīmētās vielas radioķīmiskā tīrība un īpatnējā aktivitāte (attiecīgā gadījumā).

Virszemes ūdens:

Par ņemto ūdens paraugu jāsniedz vismaz šāda informācija:

— parauga ņemšanas vietas atrašanās un apraksts, iekļaujot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi,

— parauga ņemšanas datums un laiks,

— barības vielas (kopējais N, amonijs, nitrīti, nitrāti, kopējais P, šķīstošie ortofosfāti),

— ņemšanas dziļums,

— parauga izskats (piemēram, krāsa un duļķainība),

— *DOC* un *TOC*,

— bioloģiskais skābekļa patēriņš (BSP),

— temperatūra un pH ņemšanas vietā un laikā,

— skābekļa saturs, vai redokspotenciāls (obligāti tikai, ja apstākļi nav acīmredzami aerobi),

— sāļu saturs vai elektrovadītspēja (jūras ūdens un sāļūdens gadījumā),

— suspendēto vielu saturs (ja paraugs ir duļķains),

— iespējama cita veida informācija par parauga ņemšanas vietu parauga ņemšanas laikā (piemēram, pašreizējie vai vēsturiskie dati par upju vai jūras straumju plūsmas ātrumu, tuvējām lielām izplūdēm un izplūžu veidu, laika apstākļiem pirms parauga ņemšanas laika).

Un neobligāti:

— mikrobu biomasa (piemēram, kolonijas veidojošo vienību skaits vai tiešā šūnu skaitīšana mikroskopā, izmantojot akridīnoranžo),

▼M1

— neorganiskā oglekļa saturs,

— Hlorofila-a koncentrācija kā aļģu biomasas specifisks rādītājs.

Ja veic suspendēto sedimentu testu, papildus jāsniedz šāda informācija par sedimentiem:

— sedimentu ņemšanas dziļums,

— sedimentu izskats (piemēram, krāsaini, dūņaini, mālaini vai smilšaini),

— tekstūra (piemēram, rupju smilšu, smalku smilšu, sanesu un mālu %),

— suspendēto cieto vielu sausnas masa g/l, *TOC* koncentrācija vai masas zudums izkvēlinot kā organisko vielu satura mērs,

— pH,

— skābekļa saturs vai redokspotenciāls (obligāti tikai tad, ja apstākļi nav acīmredzami aerobi).

Testēšanas apstākļi:

— paraugu glabāšanas ilgums no paraugu ņemšanas laika līdz testēšanai laboratorijā, parauga glabāšana un tā sagatavošana, testēšanas datumi,

— pielietotais testējamās vielas daudzums, testējamā koncentrācija un izmantotā standartviela,

— testējamās vielas lietošanas metode, iekļaujot šķīdinātāju izmantošanu,

— lietotā virszemes ūdens un nosēdumu (ja tos lieto) tilpums un katrā paraugu ņemšanas laikā analīzei ņemtā parauga tilpums,

— izmantotās testēšanas sistēmas apraksts.

Ja testēšana nav jāveic tumsā, informācija par "izkliedētā apgaismojuma" apstākļiem:

— informācija par metodi(-ēm), kas lietota(-as) sterilai kontrolei (piemēram, autoklavēšanas temperatūra, ilgums un skaits),

— inkubācijas temperatūra,

— informācija par analītiskajām metodēm un par metodēm, kas izmantotas radioķīmiskajos mērījumos, masas bilances noteikšanai, un fāzu sadalījuma mērījumos (ja tie veikti),

— atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

— atgūstamība procentos (sk. 1.7.1. iedaļu);

— izmantoto analītisko metožu atkārtojamība un jutība, iekļaujot noteikšanas robežu (*LOD*) un kvantitatīvās noteikšanas robežu (*LOQ*) (sk. 1.7.2. iedaļu);

▼M1

— visi mērījumu dati (iekļaujot paraugu ņemšanas laikus) un aprēķinātās vērtības tabulas veidā, un noārdīšanās līknes; katrai testa koncentrācijai un katra atkārtojuma kolbai pārskatā norāda logaritmiskā grafika slīpuma virziena lineārās korelācijas koeficientu, aprēķināto kavēšanās fāzes ilgumu un pirmās kārtas vai pseidopirmās kārtas ātruma konstanti (ja iespējams) un atbilstošo pusnoārdīšanās periodu (vai pusperiodu t_{50});

— attiecīgās vērtības norāda kā atsevišķos atkārtojumos novēroto rezultātu – piemēram, kavēšanās fāzes ilguma, noārdīšanās ātruma konstantes un pusnoārdīšanās perioda (vai t_{50}) – vidējās vērtības;

— sistēmas klasifikāciju kā neadaptētu vai adaptētu, spriežot no noārdīšanās līknes rakstura un testējamās koncentrācijas iespējamās ietekmes;

— galīgās masas bilances pārbaudes rezultāti un fāzu sadalījuma mērījumu rezultāti (ja tādi ir);

— mineralizētā ^{14}C daļa un, ja ir izmantotas specifiskas analīzes, primārās noārdīšanās galīgais līmenis;

— lietotās vielas un attiecīgā gadījumā svarīgāko pārvēršanās produktu identifikācija, molārā koncentrācija un procenti (sk. 1.8.9.5. iedaļas pirmo rindkopu);

— ja vajadzīgs, iespējamais pārveidošanās mehānisms;

— rezultātu izvērtējums.

4. **LITERATŪRA**

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

▼**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. papildinājums

^{14}C fāzu sadalījums

Lai pārbaudītu procedūru, atlikuma kopējo organiskā ^{14}C aktivitāti (*TOA*) parastajiem mērījumiem papildus jāveic masas bilances mērījumi, kurā ietilpst izdalītā $^{14}CO_2$ tieša noteikšana pēc uztveršanas absorberā (sk. 3. pielikumu). Pati par sevi pozitīva $^{14}CO_2$ veidošanās bilance ir tiešs pierādījums par bioloģisko noārdīšanos pretstatā abiotiskās noārdīšanās vai citiem zudumu mehānismiem, piemēram, iztvaikošanai vai sorbcijai. Noderīgu papildu informāciju, kas raksturo bioloģisko noārdīšano, var iegūt no *TOA* sadalījuma mērījumiem starp izšķīdušo stāvokli (izšķīdušā organiskā ^{14}C aktivitāte, *DOA*) un stāvokli cieto daļiņu veidā (daļiņu organiskā ^{14}C aktivitāte, *POA*) pēc daļiņu atdalīšanas ar membrānfiltrāciju vai centrifugēšanu. *POA* sastāv no testa vielas, kas sorbēta uz mikrobu biomasas un uz citām daļiņām, papildus testa vielas ogleklim, kas ir izmantots jauna šūnu materiāla sintēzei un tādējādi iekļauts daļiņu biomasas frakcijā. Izšķīdušā ^{14}C organiskā materiāla veidošanos var novērtēt kā *DOA* bioloģiskās noārdīšanās beigās (līknes plato daļa noārdīšanās izmaiņu laika grafikā).

Atlikuma ^{14}C fāzu sadalījumu paraugos novērtē, tos filtrējot caur 0,22 μm vai 0,45 μm membrānas filtru no materiāla, kas neadsorbē ievērojamus testējamās vielas daudzumus (piemēroti var būt polikarbonāta filtri). Ja testa vielas sorbcija uz filtra ir pārāk liela, lai to varētu neņemt vērā (jāpārbauda pirms eksperimenta), filtrēšanas vietā var izmantot ultracentrifugēšanu (2 000 g; 10 min).

Ar filtrātu vai centrifugātu rīkojas, kā 3. pielikumā aprakstīts par nefiltrētiem paraugiem. Membrānas filtrus izšķīdina piemērotā scintilāciju šķidrumā un skata, kā parasts, parasti izmantojot tikai ārējā standarta koeficienta metodi, lai koriģētu vājinājumu, vai lieto parauga oksidētāju. Ja ir izmantota centrifugēšana, no daļiņu frakcijas izveidojušos granulu atkārtoti suspendē 1–2 ml destilēta ūdens, un mazgāšanas ūdeni pārnes scintilāciju stobriņā. Pēc tam divas reizes skalo ar 1 ml destilēta ūdens un mazgāšanas ūdeni pārnes stobriņā. Vajadzības gadījumā suspensiju var iekļaut gelā šķidruma scintilāciju skaitīšanai.

▼M1

2. papildinājums

Pusnepārtrauktā procedūra

Lai panāktu grūti noārdāmu vielu pietiekamu noārdīšanos, inkubācija var būt jāveic vairākus mēnešus. Testēšanas ilgums parasti nedrīkst pārsniegt 60 dienas, ja vien sākotnējā ūdens parauga īpašības netiek saglabātas, atjaunojot testa suspensiju. Ja suspensiju neatjaunojot testējamās vielas noārdīšanās ir sākusies pirmo 60 dienu laikā, testēšanas laiku var paildzināt ne vairāk kā līdz 90 dienām.

Ilgstošas inkubācijas laikā dažādu zudumu veidošanās mehānismu dēļ un ūdens paraugā samazinoties galveno barības vielu saturam un izsīkstot primārajiem oglekļa substrātiem, var samazināties mikroorganismu daudzveidība. Tāpēc, lai pareizi noteiktu lēni noārdošos vielu noārdīšanās ātrumu, ir ieteicams izmantot pusnepārtraukto testu. Tests jāuzsāk, izmantojot pusnepārtraukto procedūru, ja, pamatojoties uz iepriekšējo pieredzi, ir sagaidāms, ka 20 % vielas noārdīšanās sasniegšanai būs trīs mēnešu ilgs inkubācijas periods. Var arī parasto sēriju testu var nomainīt ar pusnepārtraukto testu, ja sēriju procedūrā aptuveni 60 dienās testējamās vielas noārdīšanās nav novērota. Pusnepārtraukto procedūru var izbeigt un testēšanu turpināt kā sēriju testu gadījumos, kad tiek novērota nozīmīga noārdīšanās (piemēram, > 20 %).

Pusnepārtrauktajā testā ik pēc divām nedēļām aptuveni vienu trešdaļu no testējamās suspensijas tilpuma aizstāj ar svaigi ņemtu ūdeni, kam sākotnējā koncentrācijā pievienota testējamā viela. Ja veic suspendēto sedimenta testu, kas nav neobligāti, aizstāšanas ūdenim tāpat pievieno arī sedimentus sākotnējā koncentrācijā (no 0,01 līdz 1 g/l). Veicot testu ar suspendētām sedimentu cietām vielām, ir svarīgi, lai testējamā sistēma tiktu uzturēta pilnīgi suspendētā stāvoklī arī ūdens atjaunošanas laikā, un lai uzturēšanās laiks sistēmā cietajām vielām un ūdenim būtu identisks, citādi var zust paredzētā līdzība ar homogēnu ūdens sistēmu bez fiksētām fāzēm. Šo iemeslu dēļ, ja izmanto pusnepārtraukto procedūru, vēlama ir suspendēto sedimentu koncentrācija norādītā intervāla mazākajā daļā.

Testējamās vielas pievienošana nozīmē, ka testējamās vielas sākotnējā koncentrācija ar testa suspensijas daļējo atjaunošanu netiek pārsniegta un tādējādi tiek novērsta adaptācija, kas bieži novērojama pie lielām testējamo vielu koncentrācijām. Tā kā procedūrā ietilpst atkārtota inokulācija un noplicināto barības vielu un primāro substrātu kompensācija, mikroorganismu sākotnējā daudzveidība tiek atjaunota, un testēšanas ilgumu principā var pagarināt bezgalīgi. Ja izmanto pusnepārtraukto procedūru, ir svarīgi atzīmēt, ka testējamās vielas atlikuma koncentrācija ir jākoriģē, ņemot vērā testējamās vielas daudzumus, ko katrā atjaunošanas procedūrā pievieno un aizvada. Savienojumiem, kas sorbējas maz, savstarpēji aizstājamas koncentrācijas ir testējamās vielas kopējā un izšķīdušās daļas koncentrācija. Sorbcija ir nenozīmīga (< 5 %) norādītajos apstākļos (0,1 1 g cietas vielas/l) vielām, kurām log Kow < 3 (spēkā neitrāliem lipofīliem savienojumiem). To raksturo šāds aprēķina piemērs. 0,1 g/l cietu vielu aptuveni atbilst 10 mg oglekļa litrā (oglekļa daļa f_C = 0,01). Pieņemot, ka

log K_{ow} (testējamai vielai) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

sadalījuma koeficients $K_d = f_C \times K_{oc}$

tādā gadījumā izšķīdusī daļa no kopējās koncentrācijas (C-ūdens (C_w)/C-kopējā (C_t) ir:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \text{ x } 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

3. papildinājums

$^{14}CO_2$ noteikšana

$^{14}CO_2$ netieša noteikšana

Rutīnas mērījumiem netiešā metode parasti ir mazāk laikietilpīga un ir pati precīzākā, ja testējamā viela ir negaistoša un tās pārveidošanās produkti nav gaistoši. Nefiltrētus paraugus, piemēram, 5 ml tilpuma paraugus, pārnes scintilāciju stobriņos. Piemērota paraugu sākotnējā aktivitāte ir 5 000 dpm-10 000 dpm (80–170 Bq), bet minimālā sākotnējā aktivitāte ir aptuveni 1 000 dpm. Pēc paskābināšanas līdz pH 2–3 ar 1–2 pilieniem koncentrētas H_3PO_4 vai HCl ir jāizdala CO_2. CO_2 var aizvadīt, barbotējot cauri gaisu aptuveni ½–1 stundu. Otra iespēja ir 1–2 stundas stobriņus intensīvi kratīt (piemēram, uz mikroplašu kratītāja), vai maisot ne tik intensīvi, atstāt līdz nākamajai dienai. CO_2 izdalīšanas efektivitāte ir jāpārbauda (paildzinot aerēšanas vai kratīšanas laiku). Pēc tam jāpievieno scintilāciju šķidrums, kas piemērots skaitīšanai ūdens paraugos, paraugs jāhomogenizē vorteksā, un ar šķidruma scintilāciju skaitīšanu jānosaka radioaktivitāte, atņemot fona aktivitāti, kas noteikta tukšajiem paraugiem (F_B). Ja testa ūdens nav ļoti krāsains vai nesatur cietās daļiņas lielā koncentrācijā, paraugi parasti uzrāda vienādu dzēšanu, un ir pietiekami izdarīt dzēšanas koriģēšanu, izmantojot ārējo standartu. Ja testa ūdens ir stipri krāsains, var būt nepieciešama dzēšanas korekcija, izmantojot iekšējo standartu. Ja daļiņu koncentrācija ir ļoti liela, var nebūt iespējams iegūt homogēnu šķīdumu vai gelu, vai arī dzišanas atšķirības starp paraugiem var būt lielas. Tādā gadījumā testa maisījumam var izmantot turpinājumā aprakstīto skaitīšanas metodi. Ja testu izdara kā suspendētu sedimentu testu, $^{14}CO_2$ mērījumus var izdarīt netieši – ņemt homogēnu 10 ml testa ūdens/suspensijas paraugu un atdalīt fāzes, centrifugējot ar piemērotu ātrumu (piemēram, 40 000 m/s^2 15 min). Pēc tam ar ūdens fāzi rīkojas, kā aprakstīts iepriekš. Cieto daļiņu fāzē (*POA*) ^{14}C aktivitāte jānosaka, sedimentus atkārtoti suspendējot nelielā daudzumā destilēta ūdens, pārnesot scintilāciju stobriņos un pievienojot scintilāciju šķidrumu, lai veidotos gels (šim nolūkam ir pieejami īpaši scintilāciju šķidrumi). Atkarībā no daļiņu īpašībām (piemēram, organiskās vielas satura) var būt lietderīgi paraugu līdz nākamajai dienai atstāt iedarboties ar audus šķīdinošu vielu, un tad pirms scintilāciju šķidruma pievienošanas homogenizēt ar vorteksu. Cita *POA* noteikšanas metode ir sadedzināšana skābekļa pārākumā, izmantojot parauga oksidētāju. Skaitīšanai noteikti jāizmanto iekšējie standarti, un var būt javeic dzēšanas korekcijas, pievienojot iekšējo standartu katram atsevišķajam paraugam.

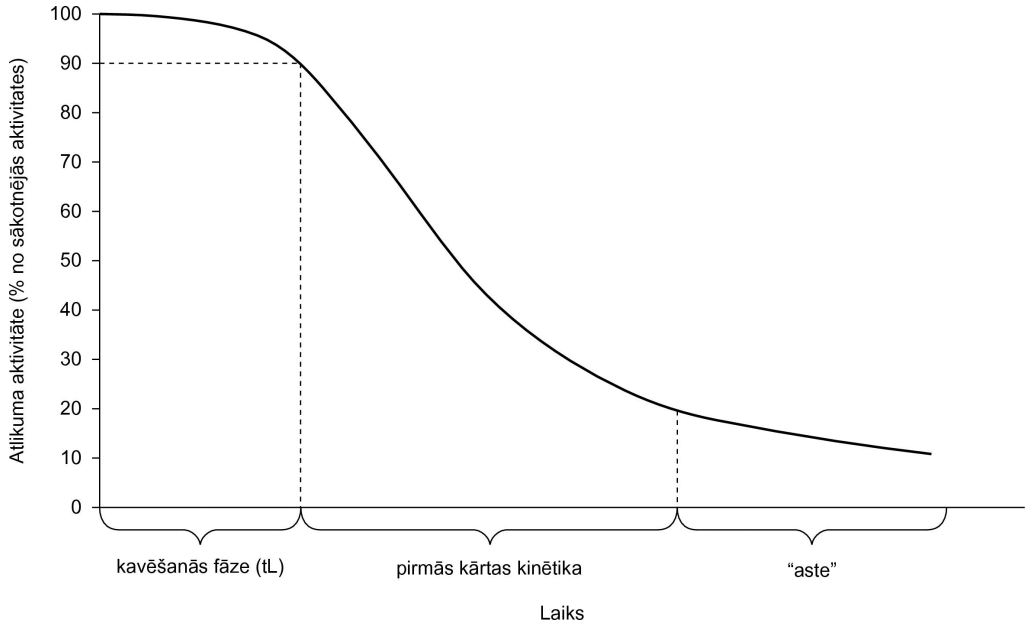
$^{14}CO_2$ tiešā noteikšana

Ja $^{14}CO_2$ izdalīšanos mēra tieši, tas ir jādara, sakomplektējot testa sākumā vairāk kolbu, un katrā mērīšanas punktā izlietojot visu testa kolbu saturu, ko paskābina līdz pH 2–3 un uztverot $^{14}CO_2$ iekšējā (kas testa sākumā ievietots katrā testa kolbā) vai ārējā absorbentā. Par absorbējošo vidi var izmantot sārmu (piemēram, 1 N NaOH šķīdumu vai NaOH granulas), etanolamīnu vai tirdzniecībā pieejamus absorbentus uz etanolamīna bāzes. Lai tieši noteiktu $^{14}CO_2$, kolbas jānoslēdz, piemēram, ar butilkaučuka membrānām.

▼**M1**

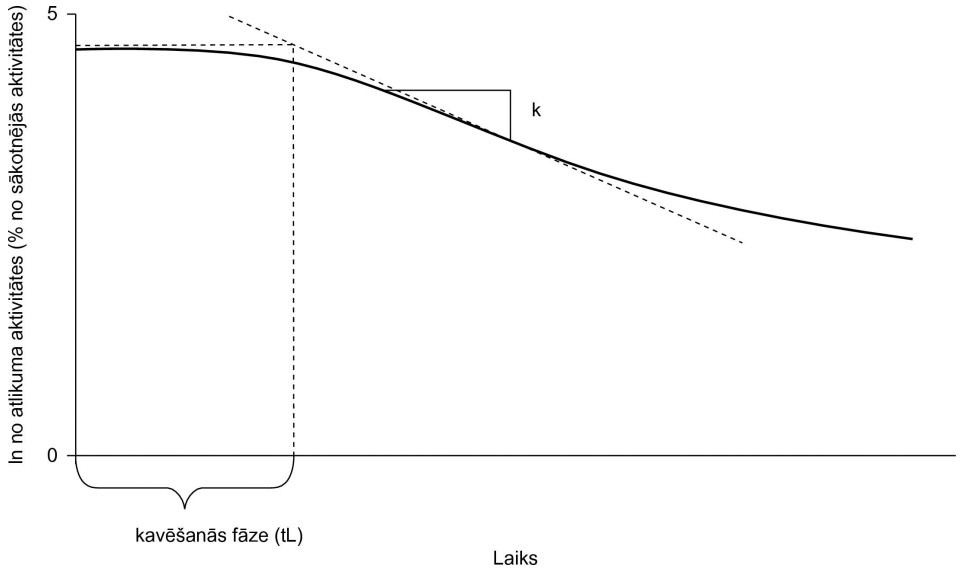
1a. attēls

Datu aritmētiskas atlikšanas piemērs (atlikuma aktivitāte atkarībā no laika)



1b. attēls

Puslogaritmiskās datu atlikšanas piemērs (atlikuma aktivitātes ln atkarībā no laika)



▼M6

C.26. ŪDENSZIEDU *(LEMNA)* SUGU AUGŠANAS INHIBĒŠANĀS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 221 (2006. gads). Šis tests ir paredzēts, lai novērtētu ķīmisku vielu toksicitāti saldūdens ūdens augiem – ūdensziedu ģints *(Lemna)* augiem. Tās pamatā ir esošās metodes (1)(2)(3)(4)(5)(6), taču šeit aprakstītās metodes modificētas saskaņā ar jaunākajiem pētījumiem un konsultācijām par vairākiem būtiskiem jautājumiem. Piedāvātā metode apstiprināta starptautiskā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (7).

2. Testēšanas metodē aprakstīta toksiskuma noteikšana, izmantojot kupraino ūdensziedu *(Lemna gibba)* un mazo ūdensziedu *(Lemna minor)* sugas, kas ir plaši pētītas un izmantotas par objektu iepriekš minētajos standartos. Ūdensziedu ģints sugu taksonomija ir sarežģīta, jo sastopami daudzveidīgi fenotipi. Kaut arī konstatēta ūdensziedu ģenētiskā mainība toksikantu ietekmē, pašlaik nav pieejams pietiekami daudz datu par šīs mainības cēloni, lai ieteiktu konkrētu klonu, kuru izmantot šajā testēšanas metodē. Jāatzīmē, ka testēšanu neveic aksēniskā jeb sterilā kultūrā, taču testa norises laikā zināmos posmos veic pasākumus, ar kuriem pēc iespējas samazina kontamināciju ar citiem organismiem.

3. Sniegta sīkāka informācija par testēšanas norisi gan ar testa šķīduma atjaunošanu (pusstatiskā metode un caurplūdes metode), gan arī bez šķīduma atjaunošanas (statiskā metode). Atkarībā no testēšanas mērķiem un reglamentējošām prasībām ieteicams apsvērt pusstatiskās metodes un caurplūdes metodes lietošanu, piemēram, ķīmiskajām vielām, kas ātri izdalās no šķīduma iztvaikošanas, fotonoārdīšanās, izgulsnēšanās vai bioloģiskās noārdīšanās rezultātā. Papildu norādījumi sniegti avotā (8).

4. Izmantotās definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

5. Eksponenciāli augošās ūdensziedu ģints augu kultūrām ļauj augt kā monokultūrām dažādās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijās laikā līdz septiņām dienām. Šā testa mērķis ir kvantitatīvi noteikt testējamās vielas ietekmi uz aug (u veģetatīvo augšanu konkrētā periodā, izvērtējot izvēlētos mērāmos parametrus. Ūdensziedu plātnīšu skaits ir primārais mērāmais parametrs. Jāmēra vēl vismaz viens cits parametrs (kopējā plātnīšu platība, sausvars vai svaigsvars), tāpēc ka dažas ķīmiskās vielas citus mērāmos parametrus var ietekmēt vairāk nekā plātnīšu skaitu. Lai kvantitatīvi noteiktu testējamās vielas ietekmi, augšanu testa šķīdumos salīdzina ar augšanu kontrolšķīdumos un atrod koncentrāciju, kas izraisa noteiktu augšanas inhibēšanos par x % (piemēram, 50 %), ko izsaka kā EC_x (piemēram, EC_{50}).

6. Testa beigupunkts ir augšanas inhibīcija, ko izsaka kā mērāmā parametra (vidējā specifiskā augšanas ātruma) logaritmisko pieaugumu ekspozīcijas periodā. No specifiskā augšanas ātruma vidējām vērtībām, kas reģistrētas testa šķīdumu rindā, nosaka koncentrāciju, kas nodrošina noteikta augšanas ātruma inhibēšanos par x % (piemēram, 50 %), un to izsaka kā E_rC_x (piemēram, E_rC_{50}).

7. Šajā testēšanas metodē izmantotais papildu atkarīgais mainīgais ir ražība, kas var būt nepieciešams, lai dažās valstīs izpildītu īpašas regulējuma prasības. Tas ir definēts kā mērāmais parametrs ekspozīcijas perioda beigās, no kura atņemts attiecīgs ekspozīcijas perioda sākumā izmērīts parametrs. No ražības skaitliskajām vērtībām, ko iegūst testa šķīdumu rindā, atrod koncentrāciju, kas izraisa noteiktu ražības samazināšanos par x % (piemēram, par 50 %), ko izsaka kā E_yC_x (piemēram, E_yC_{50}).

▼**M6**

8. Papildus statistiski var noteikt zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju *(LOEC)* un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)*.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

9. Jābūt pieejamai pietiekami jutīgai analīzes metodei vielas kvantitatīvai noteikšanai testēšanas barotnē.

10. Nosakot testēšanas apstākļus, var noderēt informācija par testējamo ķīmisko vielu – struktūrformula, tīrības pakāpe, šķīdība ūdenī, stabilitāte ūdenī un gaismā, pK_a, K_{ow}, tvaika spiediens un bioloģiskās noārdīšanās spēja. Šķīdību ūdenī un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti un novērtētu, vai testa periodā iespējami būtiski testējamās ķīmiskās vielas zudumi. Tā iespējams gūt priekšstatu par to, vai jāveic īpaši pasākumi šādu zudumu kontrolei. Ja informācija par testējamās ķīmiskās vielas šķīdību un stabilitāti ir neskaidra, ieteicams to novērtēt testa apstākļos, t. i., ar barotni, temperatūru, apgaismojuma režīmu, ko izmantos testa laikā.

11. Ja īpaši svarīga ir testēšanas barotnes pH kontrole, piemēram, ja testējamie metāli vai ķīmiskās vielas ir hidrolītiski nestabilas, barotnei ieteicams pievienot buferšķīdumu (sk. 21. punktu). Papildu norādījumi par testiem ar tādām vielām, kas grūti testējamas to fizikālķīmisko īpašību dēļ, ir sniegti (8).

TESTA DERĪGUMS

12. Lai testēšanas rezultātus atzītu par derīgiem, plātnīšu skaita divkāršošanās laikam kontrolē jābūt mazākam par 2,5 dienām (60 h), kas atbilst aptuveni septiņkārtīgam pieaugumam septiņās dienās un vidējam specifiskajam augšanas ātrumam 0,275 d^{-1}. Izmantojot šajā testēšanas metodē aprakstītās barotnes un testa apstākļus, šo kritēriju var sasniegt statiskā testa režīmā (5). Tāpat sagaidāms, ka šo kritēriju var sasniegt, izmantojot testā pusstatisko metodi un caurplūdes metodi. Divkāršošanās laika aprēķināšana norādīta 49. punktā.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

13. Ķīmiskā(-s) standartviela(-s), piemēram, 3,5-dihlorfenols, kas izmantots starptautiskā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (7), var testēt, lai pārbaudītu testa procedūru. Ķīmisko standartvielu ieteicams testēt vismaz divas reizes gadā vai, ja testēšana tiek veikta retāk, vienlaikus ar testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes noteikšanu.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Aprīkojums

14. Visām iekārtām, kas ir saskarē ar testa vidi, jābūt izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Stikla trauki, kas paredzēti kultivēšanai un testēšanai, jāattīra no ķīmiskiem kontaminantiem, kas varētu iekļūt testēšanas barotnē, un tiem jābūt steriliem. Testa traukiem jābūt pietiekami lieliem, lai dažādu koloniju plātnītes kontroles traukos varētu brīvi augt, testa beigās nepārklājoties cita ar citu. Nav būtiski, vai saknes pieskaras testa trauka dibenam, tomēr visiem testa traukiem ieteicamais minimālais dziļums ir

▼M6

20 mm
un minimālais tilpums 100 ml. Testa trauku izvēlei nav citas būtiskas nozīmes, ja vien tiek izpildītas minētās prasības. Par piemērotām atzītas arī atbilstoša izmēra stikla vārglāzes, kristalizatori vai Petri plates no stikla. Testa traukiem jābūt apsegtiem, lai pēc iespējas samazinātu iztvaikošanu un nejaušas kontaminācijas iespēju, vienlaikus nodrošinot nepieciešamo gaisa apmaiņu. Piemēroti ir tādi testa trauki un jo īpaši to vāki, kas nenoēno augus un nerada gaismas spektra izmaiņas.

15. Kultūras un testa traukus nedrīkst izvietot vienkopus. Šī prasība vislabāk izpildāma, izmantojot atsevišķas audzēšanas kameras, inkubatorus vai telpas. Apgaismojums un temperatūra jākontrolē un jāuztur nemainīgā līmenī (sk. 35.–36. punktu).

Testa organismi

16. Šajā testā izmantojamie organismi ir kuprainais ūdenszieds *(Lemna gibba)* vai mazais ūdenszieds *(Lemna minor)*. Toksiskuma noteikšanai izmantojamo ūdensziedu sugu īss apraksts dots 2. papildinājumā. Augu materiāls jāsaņem no kultūru kolekcijas, no citas laboratorijas vai jāievāc lauka apstākļos. Lauka apstākļos ievākti augi vismaz astoņas nedēļas pirms izmantošanas jāuztur kultūrā tieši tādā barotnē, kādu izmanto testēšanai. Ja augus vāc laukā, vietām, kur ievāc kultūras sākummateriālu, jābūt bez redzamiem kontaminācijas avotiem. Ja augu materiāls saņemts no citas laboratorijas vai no kultūru kolekcijas, tas jāuztur līdzīgi vismaz trīs nedēļas. Visos gadījumos jānorāda testā izmantojamā augu materiāla izcelsmes avots, suga un klons (ja zināms).

17. Jāizmanto monokultūras, kas redzami nav kontaminētas ar citiem organismiem, piemēram, aļģēm un vienšūņiem. Veselīgi mazā ūdenszieda *(L. minor)* augi sastāv no kolonijām, ko veido divas līdz piecas plātnītes, bet veselīgā kuprainā ūdenszieda *(L. gibba)* kolonijā var būt pat septiņas plātnītes.

18. Testā izmantojamo augu kvalitāte un vienveidīgums būtiski ietekmē testa rezultātus, tāpēc tie jāizraugās rūpīgi. Jāizmanto jauni, ātri augoši augi bez redzamiem bojājumiem vai krāsas izmaiņām (hlorozes). Labas kvalitātes kultūras pazīme ir daudz koloniju, kas sastāv no vismaz divām plātnītēm. Liels atsevišķu plātnīšu skaits liecina par vidisko stresu, piemēram, barības vielu nepietiekamību, un testēšanai augus no šādām augu kultūrām izmantot nedrīkst.

Audzēšana

19. Lai manipulācijas kultūras uzturēšanai varētu veikt retāk (piemēram, ja ūdensziedu testi tuvākajā laikā nav plānoti), kultūras glabā samazināta apgaismojuma apstākļos pazeminātā temperatūrā (4–10 °C). Sīkāka informācija par kultivēšanu ir dota 3. papildinājumā. Ja novērojamas aļģu vai citu organismu kontaminācijas pazīmes, jāņem ūdensziedu plātnīšu apakšparaugs, jāveic tā virsmas sterilizācija un pēc tam tas jāpārnes svaigā barotnē (sk. 3. papildinājumu). Šādā gadījumā atlikusī kontaminētā kultūra jālikvidē.

20. Vismaz septiņas dienas pirms testēšanas sākuma pietiekamu daudzumu koloniju aseptiski pārvieto uz svaigu, sterilu barotni un 7–10 dienas kultivē testa apstākļos.

Testēšanas barotne

21. Turpmāk minētas vairākas barotnes, kas ieteicamas mazā ūdenszieda *(Lemna minor)* un kuprainā ūdenszieda *(Lemna gibba)* kultivēšanai. Rūpīgi jāapsver pH buferšķīduma pievienošana testēšanas barotnēm (MOPS 4-morfolīnpropānsulfonskābe; *CAS* Nr. 1132-61-2 mazā ūdenszieda barotnei un $NaHCO_3$ kuprainā ūdenszieda barotnei), ja iespējams, ka tas varētu reaģēt ar testējamo ķīmisko vielu un ietekmēt tās toksiskuma izpausmi. Var izmantot arī Steinberga *(Steinberg)* barotni (9), ja tā atbilst derīguma kritērijiem.

▼M6

22. Arī modificēta Zviedrijas standartos (SIS) minētā ūdensziedu barotne ieteicama mazā ūdenszieda kultivēšanai un testēšanai. Šīs barotnes sastāvs dots 4. papildinājumā.

23. Barotne 20X – AAP, kas aprakstīta 4. papildinājumā, ieteicama kuprainā ūdenszieda kultivēšanai un testēšanai.

24. Arī Steinberga barotne, kas aprakstīta 4. papildinājumā, ir piemērota mazā ūdenszieda kultivēšanai, un ja tā atbilst derīguma kritērijiem, izmantojama arī kuprainā ūdenszieda kultivēšanai.

Testa šķīdumi

25. Testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdumu parasti gatavo, izšķīdinot ķīmisko vielu barotnē.

26. Lielākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija parasti nav augstāka par vielas šķīdību ūdenī testa apstākļos. Jānorāda, ka ūdensziedi *(Lemna)* peld barotnes virspusē un uz tiem var iedarboties vielas, kas uzkrājas ūdens un gaisa saskares zonā (piemēram, ūdenī slikti šķīstošas vai hidrofobas vielas vai virsmaktīvās vielas). Tādos apstākļos ekspozīciju var radīt viela, kuras nav šķīdumā, un atkarībā no testējamās vielas īpašībām testa koncentrācijas var pārsniegt tās šķīdību ūdenī. No slikti šķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām var būt jāsagatavo koncentrēti ķīmiskās vielas izejšķīdumi vai dispersijas, izmantojot organiskos šķīdinātājus vai disperģētājvielas, lai atvieglotu vielas disperģēšanu un izšķīdināšanu, dodot iespējas paaugstināt testējamās vielas dozēšanas precizitāti testēšanas barotnē. Tomēr jādara viss iespējamais, lai izvairītos no šādu materiālu lietošanas. Šīs palīgvielas – šķīdinātāji vai disperģētājvielas – nedrīkst būt fitotoksiskas. Piemēram, daži parasti izmantotie šķīdinātāji, kas nav fitotoksiski koncentrācijā virs 100 µl/l, ir acetons un dimetilformamīds. Ja lieto šķīdinātājus vai disperģētājvielas, jānorāda šo vielu gala koncentrācija un tā jāuztur minimālā līmenī ($\leq$ 100 µl/l), un visos variantos – testējamās vielas un kontrolgrupas traukos – šķīdinātājam vai disperģētājvielai jābūt vienādā koncentrācijā. Papildu norādījumi par disperģētājvielu lietošanu ir doti (8).

Testa grupas un kontrolgrupas

27. Piemērotu testēšanas koncentrāciju izvēlei ieteicams izmantot priekšzināšanas par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu ūdensziediem *(Lemna)*, piemēram, diapazona noteikšanas testa datus. Galīgajā toksiskuma testā parasti jābūt vismaz piecām testējamām koncentrācijām, kas sakārtotas ģeometriskā progresijā. Vēlams, lai starp testa koncentrāciju kvocients nepārsniegtu 3,2, bet lielāku vērtību var izmantot tad, ja koncentrācijas–atbildreakcijas līkne ir lēzena. Ja testē mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas ir jāpamato. Katram testējamās koncentrācijas variantam jābūt vismaz trijos replikātos.

28. Nosakot testējamo koncentrāciju diapazonu (diapazona noteikšanai un/vai galīgajam toksiskuma testam), jāņem vērā šādi apsvērumi.

— EC_x noteikšanā testa koncentrācijām jāietver EC_x vērtība, lai nodrošinātu pietiekamu ticamības līmeni. Piemēram, nosakot EC_{50}, augstākajai testētajai koncentrācijai jābūt lielākai par EC_{50} vērtību. Ja EC_{50} vērtība atrodas ārpus testa koncentrāciju diapazona, attiecīgie ticamības intervāli būs lieli un nebūs iespējama modeļa statistiskā derīguma korekta novērtēšana.

— Ja mērķis ir noteikt *LOEC/NOEC*, zemākajai testa koncentrācijai jābūt pietiekami mazai, tā, lai augšana nebūtu ievērojami lēnāka kā kontrolgrupā. Turklāt augstākajai testa koncentrācijai jābūt pietiekami lielai, tā,

▼M6

lai augšana būtu ievērojami lēnāka nekā kontrolgrupā. Ja tā nav, testēšana jāatkārto, izmantojot citādu koncentrāciju diapazonu (ja vien lielākā koncentrācija nav tuvu šķīdības robežai vai maksimāli pieļaujamajai robežkoncentrācijai, piemēram, 100 mg/l).

29. Katrā testā iekļaujama kontrolgrupa, kurā ir tāda pati barotne, vienāds plātnīšu un koloniju skaits, vidiskie apstākļi, manipulācijas kā testa traukos, bet bez testējamās ķīmiskās vielas. Ja par palīgvielu lieto šķīdinātāju vai disperģētājvielu, kontrolgrupai papildus jāpievieno tas pats šķīdinātājs/disperģētājviela tieši tādā koncentrācijā kā traukos ar testējamo ķīmisko vielu. Kontrolreplikātu skaitam (arī traukiem ar šķīdinātāju, ja to lieto) jābūt vismaz tādam pašam kā katras testējamās koncentrācijas trauku skaitam, bet ideālā gadījumā divreiz lielākam par to.

30. Ja nav nepieciešams noteikt *NOEC*, testēšanas plānu var mainīt, palielinot testējamo koncentrāciju skaitu un samazinot katras koncentrācijas replikātu skaitu. Taču kontrolgrupā jābūt vismaz trīs replikātiem.

Ekspozīcija

31. Kolonijas, kas sastāv no divām līdz četrām saredzamām plātnītēm, no inokulācijas kultūras aseptiskos apstākļos pārvieto uz testa traukiem, sadalot pēc nejaušās izvēles principa. Katrā testa traukā jāatrodas pavisam 9–12 plātnītēm. Plātnīšu un koloniju skaitam visos testa traukos jābūt vienādam. Šīs metodes izmantošanas pieredze un starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas dati liecina, ka trīs replikāti katrai koncentrācijai, katram replikātam sākotnēji saturot 9–12 plātnītes, ir pietiekami, lai starp koncentrācijām konstatētu aptuveni 4–7 % augšanas atšķirības inhibēšanās dēļ, rēķinot pēc augšanas ātruma (10–15 %, rēķinot pēc ražības) (7).

32. Testa trauki inkubatorā jāizvieto pēc nejaušības principa, lai pēc iespējas samazinātu telpiskās atšķirības gaismas intensitātes vai temperatūras ziņā. Nepieciešams blokveida sadalījums vai trauku pārvietošana pēc nejaušības principa, izdarot novērojumus (vai arī trauku pārvietošana biežāk).

33. Ja orientējošajā testā konstatē, ka testa periodā (7 dienas) testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju nav iespējams uzturēt (t. i., izmērītā koncentrācija nokrītas zem 80 % no sākotnējās koncentrācijas), ieteicams izmantot pusstatisko metodi. Šādā gadījumā kolonijas jāpārvieto svaigi sagatavotā testēšanas barotnē un kontrolšķīdumos vismaz divas reizes testa laikā (t. i., trešajā un piektajā dienā). Tas, cik bieži eksponē svaigai barotnei, atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas stabilitātes; lai ļoti nestabilām un gaistošām vielām uzturētu pēc iespējas nemainīgu koncentrāciju, tas var būt jādara biežāk. Dažkārt var būt jāizmanto caurplūdes pieeja (8)(10).

34. Ekspozīcijas modeļi, kas paredz testējamo vielu izsmidzināt uz auga lapām, šajā testēšanas metodē nav aprakstīti, bet ir atrodami (11).

Inkubācijas apstākļi

35. Jāizmanto pastāvīgas silti vai vēsi baltas fluorescentas gaismas avots, kas nodrošina apgaismojuma intensitāti diapazonā 85–135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, mērot fotosintēzes aktivitātei atbilstošā spektra daļā (400–700 nm) tādā pašā attālumā no gaismas avota, kādā atrodas ūdensziedu *(Lemna)* plātnītes (ekvivalents 6 500–10 000 luksiem). Jebkuras novirzes no izraudzītās apgaismojuma intensitātes testa zonā nedrīkst pārsniegt ± 15 % Gaismas detektēšanas un

▼M6

mērīšanas metodes, jo īpaši sensora veids, ietekmē izmērītās vērtības. Par labākiem atzīstami sfēriskie sensori (reaģē uz gaismu visos leņķos virs mērījumu plaknes un zem tās) un "kosinusa" sensori (reaģē uz gaismu visos leņķos virs mērījumu plaknes) salīdzinājumā ar vienvirziena sensoriem, un ar tiem var iegūt augstākus nolasījumus no šeit aprakstītā veida daudzpunktu gaismas avota.

36. Temperatūrai testa traukos jābūt 24 ± 2 °C. Kontrolgrupas barotnē testēšanas laikā pH nedrīkst palielināties par vairāk kā 1,5 vienībām. Tomēr testēšanas rezultāti nav uzskatāmi par nederīgiem tādu noviržu dēļ, kas pārsniedz 1,5 vienības, ja tie atbilst citiem derīguma kritērijiem. Papildu uzmanība īpašos gadījumos jāvelta pH novirzēm – ja jātestē nestabilas vielas vai metāli. Sīkākus norādījumus sk. (8).

Ilgums

37. Testu beidz septiņas dienas pēc augu pārvietošanas uz testa traukiem.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

38. Testēšanas sākumā jāizskaita un jāreģistrē plātnīšu skaits testa traukos, pārliecinoties, ka tiek uzskaitītas uz āru izvirzītas, skaidri saskatāmas plātnītes. Plātnīšu skaits jānosaka testa sākumā, tad vismaz vienu reizi trīs dienās ekspozīcijas periodā (t. i., vismaz divas reizes septiņu dienu periodā) un testa beigās, uzskaitot gan normālās, gan anomālās plātnītes. Jāievēro augu attīstības izmaiņas, piemēram, plātnīšu lielums, ārējais izskats, nekrozes pazīmes, hloroze, kumpainība, koloniju sadalīšanās, peldspējas zudums, kā arī saknīšu garums un izskats. Jānovēro arī būtiskas testēšanas barotnes iezīmes (piemēram, neizšķīdušas vielas, aļģu augšana testa traukā).

39. Papildus plātnīšu skaita noteikšanai testēšanas laikā jānovērtē arī testējamās ķīmiskās vielas ietekme uz vienu (vai vairākiem) šādiem mērāmajiem parametriem:

i) kopējais plātnīšu laukums;

ii) sausssvars;

iii) svaigsvars.

40. Kopējā plātnīšu laukuma noteikšanai ir tāda priekšrocība, ka to var noteikt katram testējamā varianta un kontrolgrupas traukam testa sākumā, norises gaitā un testa beigās. Saussvars un svaigsvars jānosaka testa sākumā paraugā, kas ir reprezentatīvs laboratorijas kultūrai, kuru lietos par inokulātu testa sākšanai, kā arī testa beigās augu materiālā no katra testējamā varianta un kontrolgrupas trauka. Ja plātnīšu laukums netiek mērīts, vēlams noteikt saussvaru, nevis svaigsvaru.

41. Kopējo plātnīšu laukumu, saussvaru un svaigsvaru varu var noteikt šādi:

i) *kopējā plātnīšu platība:* kopējo visu koloniju platību var noteikt ar attēlu analīzi. Testa trauka un augu siluetus var fiksēt ar videokameru (t. i., novietojot trauku uz gaismas kameras) un iegūto attēlu digitalizēt. Ja kalibrēšanu veic ar plakanas formas modeļiem ar zināmu laukumu, var noteikt kopējo plātnīšu platību testa traukā. Jāraugās, lai nebūtu traucējumu, ko rada testa trauka malas. Alternatīva, bet darbietilpīgāka metode ir fotografēt testa traukus un augus, izgriezt iegūto koloniju siluetu un izmērīt to laukumu, izmantojot lapu virsmas platības analizatoru vai milimetrpapīru. Piemērotas ir arī citas metodes (piemēram, izmantojot papīru, var noteikt papīra masas attiecību starp koloniju silueta laukumu un laukuma vienību);

▼**M6**

ii) *saussvars:* no katra testa trauka ievāc visas kolonijas un skalo ar destilētu vai dejonizētu ūdeni. Tās nosusina, lai atbrīvotos no liekā ūdens, un 60 °C temperatūrā žāvē līdz nemainīgai masai. Jāņem arī saknīšu fragmenti. Sausna jānosaka vismaz ar 0,1 mg precizitāti;

iii) *svaigsvars:* visas kolonijas pārvieto iepriekš nosvērtās polistirola (vai cita inerta materiāla) mēģenēs ar noapaļotu apakšdaļu, kurā ir sīkas (1 mm) atveres. Mēģenes 10 minūtes istabas temperatūrā centrifugē ar ātrumu 3 000 rpm. Mēģenes ar notecinātajām kolonijām atkal nosver un aprēķina svaigsvaru, atņemot tukšas mēģenes masu.

Mērījumu un analītiskās noteikšanas biežums

42. Izmantojot statisko testēšanas plānu, pH jāmēra katrā apstrādes traukā testa sākumā un beigās. Pusstatiskā testēšanas plāna gadījumā pH jāmēra katrā "svaigā" testa šķīduma partijā pirms katras šķīduma nomaiņas, kā arī attiecīgajās "izlietoto" šķīdumu porcijās.

43. Gaismas intensitāte jāmēra audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā tādā pašā attālumā no gaismas avota, kādā atrodas ūdensziedu *(Lemna)* plātnītes. Mērījumi jāveic vismaz vienreiz testēšanas laikā. Barotnes temperatūras mērīšanu aizvietotājtraukā, kas novietots identiskos apstākļos audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā, mēra vismaz vienreiz dienā.

44. Testa laikā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos. Statiskajos testos minimālā prasība ir noteikt koncentrāciju testēšanas sākumā un beigās.

45. Pusstatiskajos testos, kad nav gaidāms, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija saglabāsies ± 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, jāanalizē visi no jauna pagatavotie testa šķīdumi, kā arī tie paši šķīdumi pirms katras ievadīšanas testa traukos (sk. 33. punktu). Tomēr tādos testos, kur testējamās ķīmiskās vielas izmērītā sākotnējā koncentrācija nav ± 20 % no nominālās koncentrācijas, bet pietiekami pierādījumi liecina, ka sākotnējā koncentrācija ir atkārtojama un stabila (t. i., 80–120 % no sākotnējās koncentrācijas), ķīmiskās analīzes var veikt tikai pie pašām lielākajām un mazākajām testējamajām koncentrācijām. Visos gadījumos testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju noteikšana veicama pirms svaiga šķīduma pievienošanas vienā replikāta traukā katrai testa koncentrācijai (vai to trauku saturā, kas apvienoti replikātā).

46. Ja izmanto caurplūdes metodi, paraugus ņem līdzīgā režīmā, kā aprakstīts pusstatiskās metodes gadījumā, tostarp ņem analīzes testēšanas sākumā, vidusposmā un beigās; veikt mērījumus "izlietotajos" šķīdumos nav lietderīgi. Šāda veida testā šķīdinātāja un testējamās ķīmiskās vielas vai testējamās ķīmiskās vielas izejšķīduma plūsmas ātrums jāpārbauda katru dienu.

47. Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir apmierinoši uzturēta ± 20 % robežās no nominālās vai testa laikā izmērītās sākotnējās koncentrācijas, tad rezultātu analīzes pamatā var būt nominālās vai izmērītās sākotnējās vērtības. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % diapazonā, rezultātu analīzes pamatā jābūt koncentrāciju ģeometriskai vidējai vērtībai ekspozīcijas laikā vai modeļiem, kas raksturo testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas samazināšanos (8).

▼M6

Robežtests

48. Noteiktos apstākļos, piemēram, kad orientējošais tests norāda, ka testējamajai ķīmiskajai vielai nav toksiskas ietekmes koncentrācijās līdz 100 mg/l vai līdz šķīdības robežai testēšanas barotnē (atkarībā no tā, kura ir zemāka), var veikt robežtestu, kurā salīdzina kontrolgrupas un vienas apstrādes grupas (100 mg/l vai koncentrācija, kas vienāda ar šķīdības robežu) atbildreakcijas. Noteikti ieteicams to apstiprināt, analizējot ekspozīcijas koncentrācijas. Uz robežtestu attiecas visi iepriekš aprakstītie testēšanas nosacījumi un derīguma kritēriji, izņemot to, ka apstrādes replikātu skaits jādubulto. Augšanu kontrolgrupā un apstrādes grupā var analizēt, izmantojot statistisku testu vidējo vērtību salīdzināšanai, piemēram, Stjūdenta t-testu.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Divkāršošanās laiks

49. Lai noteiktu ūdensziedu plātnīšu skaita divkāršošanās laiku *(T_d)* un pētījuma atbilstību šim derīguma kritērijam (12. punkts), aprēķiniem ar kontrolgrupas traukos iegūtiem datiem izmanto šādu formulu:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kur μ ir vidējais specifiskais augšanas ātrums, ko nosaka, kā aprakstīts 54.–55. punktā.

Atkarīgie mainīgie

50. Testēšanas mērķis ir noteikt testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz ūdensziedu *(Lemna)* veģetatīvo augšanu. Šī testa metode ietver divus atkarīgos mainīgos, jo dažādās jurisdikcijās ir priekšroku dod atšķirīgiem parametriem un atšķiras regulējuma vajadzības. Lai testēšanas rezultāti būtu pieņemami visās jurisdikcijās, rezultāti ir jāizvērtē, izmantojot abus turpmāk aprakstītos atkarīgos mainīgos a) un b).

a) *Vidējais* specifiskais *augšanas ātrums:* šo atkarīgo mainīgo aprēķina, pamatojoties uz plātnīšu skaita logaritmu izmaiņām un pamatojoties uz vēl cita mērāmā parametra (kopējās plātnīšu platības, saussvara vai svaigsvara) logaritmu izmaiņām laikā (izteiktām dienās) kontrolgrupās un katrā apstrādes grupā. To dažreiz sauc par relatīvo augšanas ātrumu (12).

b) *Ražība:* šo atkarīgo mainīgo aprēķina, pamatojoties uz plātnīšu skaita izmaiņām un uz vēl kāda cita mērāma parametra (kopējās plātnīšu zonas platības, saussvara vai svaigā svara) izmaiņām kontrolgrupās un katrā apstrādes grupā periodā līdz testēšanas beigām.

51. Jānorāda, ka toksiskuma vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos abus atkarīgos mainīgos, nav savstarpēji salīdzināmas, un šī atšķirība jāapzinās, izmantojot testa rezultātus. Tā kā katras pieejas matemātiskais pamats ir atšķirīgs, tad, ja būs ievēroti šīs testa metodes testa nosacījumi, EC_x vērtības, kuru pamatā ir vidējais specifiskais augšanas ātrums (E_rC_x), kopumā būs augstākas nekā rezultāti, kuru pamatā ir ražība (E_yC_x). To nedrīkst interpretēt kā šo abu iegūto parametru jutības atšķirību; šīs vērtības vienkārši ir matemātiski atšķirīgas. Vidējā specifiskā augšanas ātruma koncepcijas pamatā ir ūdensziedu vispārējais eksponenciālās augšanas modelis kultūrās, kuru augšanu neierobežo; toksiskumu tajās aplēš pēc ietekmes uz augšanas ātrumu neatkarīgi no kontrolgrupas absolūtā specifiskā augšanas ātruma līmeņa,

▼M6

koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficienta vai testa ilguma. Savukārt rezultāti, kuru pamatā esošais atkarīgais mainīgais ir ražība, ir atkarīgi no visiem citiem minētajiem mainīgajiem. E_yC_x ir atkarīgs no katrā testā iekļauto ūdensziedu sugu vidējā specifiskā augšanas ātruma un no maksimālā specifiskā augšanas ātruma, kas var būt atšķirīgs ne tikai katrai sugai, bet arī dažādiem kloniem. Šo atkarīgo mainīgo nevajadzētu izmantot, lai salīdzinātu dažādu ūdesnziedu sugu vai pat atšķirīgu klonu jutību pret toksikantiem. Kaut arī zinātnē priekšroku dod toksiskuma noteikšanai pēc vidējā specifiskā augšanas ātruma, lai apmierinātu dažu valstu pašreizējās regulatīvās prasības, šajā testēšanas metodē ir ietverta arī toksiskuma noteikšana pēc ražības.

52. Toksiskuma noteikšanā jāpamatojas uz plātnīšu skaitu un vēl vismaz vienu citu mērāmo parametru (plātnīšu zonas kopējā platība, saussvars vai svaigais svars), jo dažas vielas var ietekmēt citus mērāmos lielumus vairāk nekā plātnīšu skaitu. Šo ietekmi nevar noteikt, aprēķinot tikai plātnīšu skaitu.

53. Plātnīšu skaits, kā arī jebkurš cits iegūtais mērāmais parametrs, t. i., plātnīšu zonas kopējā platība, saussvars vai svaigsvars, jāapkopo tabulā kopā ar testējamās vielas koncentrācijam katrā mērījumā. Turpmākā datu analīzē, piemēram, lai noteiktu *LOEC*, *NOEC* vai EC_x, jāpamatojas uz katrā atsevišķā replikāta vērtībām, nevis katras apstrādes grupas aprēķināto vidējo vērtību.

Vidējais specifiskais augšanas ātrums

54. Vidējo specifisko augšanas ātrumu noteiktā laika posmā aprēķina kā plātnīšu skaita un vēl cita mērāmā lieluma (kopējās plātnīšu zonas, saussvara vai svaigsvara) logaritmisko pieaugumu katram replikātam kontrolgrupās un apstrādes grupās, izmantojot formulu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kur:

— μ_{i-j}: ir vidējais specifiskais augšanas ātrums laika periodā no i līdz j;

— N_i: mērāmais lielums testa traukā vai kontroltraukā laika punktā i;

— N_j: mērāmais lielums testa traukā vai kontroltraukā laika punktā j;

— t: laika posms no i līdz j.

Katrā apstrādes grupā un kontrolgrupā aprēķina vidējo augšanas ātrumu un aplēš tā dispersiju.

55. Vidējais specifiskais augšanas ātrums jāaprēķina visam testa periodam (laika punkts "i" ir testa sākums, un laika punkts "j" ir testa beigas). Katrai testa koncentrācijai un kontrolgrupai aprēķina vidējā specifiskā augšanas ātruma vidējo vērtību un aplēš dispersiju. Papildus jānosaka augšanas ātrums pa posmiem, lai novērtētu testējamās ķīmiskās vielas ietekmi parādīšanos ekspozīcijas laikā (piemēram, pārbaudot logaritmiski transformētās augšanas līknes). Vidējā augšanas ātruma būtiskas atšķirības no individuālo posmu augšanas ātruma liecina par novirzi no konstantas eksponenciālas augšanas un to, ka rūpīgi jāanalizē augšanas līknes. Šajā gadījumā konservatīva pieeja būtu salīdzināt apstrādāto kultūru specifisko augšanas ātrumu maksimālās inhibēšanās periodā ar kontrolgrupu specifisko augšanas ātrumu tajā pašā laika periodā.

56. Procentuālo augšanas ātruma inhibēšanos (I_r) katrai testējamajai koncentrācijai (apstrādes grupai) aprēķina pēc šādas formulas:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

kur:

— $\%I_r$: vidējā specifiskā augšanas ātruma inhibēšanās procentos;

— μ_C: vidējā μ vērtība kontrolgrupā

— μ_T: vidējā μ vērtība apstrādes grupā

Ražība

57. Ietekmi uz ražību nosaka, pamatojoties uz diviem mērāmajiem parametriem – plātnīšu skaitu un vēl kādu citu mērāmo lielumu (kopējo plātnīšu zonas platību, saussvaru vai svaigsvaru) katrā testa traukā testēšanas sākumā un beigās. Sākotnējās biomasas saussvaru vai svaigsvaru nosaka, ņemot plātnīšu paraugus no tās pašas partijas, ko izmanto testa trauku inokulēšanai (sk. 20. punktu). Katrai apstrādes grupai un kontrolgrupai aprēķina ražības vidējo vērtību un aplēš dispersiju. Vidējo ražības inhibīcijas procentuālo vērtību ($\%\ I_y$) katrai apstrādes grupai var aprēķināt šādi:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

kur:

— $\%\ I_y$ ražības samazināšanās procentuālā vērtība;

— b_C kontrolgrupas biomasa testa beigās, no kuras atņemta biomasa testa sākumā;

— b_T apstrādes grupas biomasa testa beigās, no kuras atņemta biomasa testa sākumā.

Koncentrācijas–atbildreakcijas līkņu konstruēšana

58. Koncentrācijas–atbildreakcijas līknes konstruē, atkarīgā mainīgā vidējo inhibīciju procentos (I_r vai I_y, ko aprēķina, kā noteikts 56. vai 57. punktā) grafiski attēlojot testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas logaritmu.

EC_x noteikšana

59. EC_x (piemēram, EC_{50}) aprēķina pēc vidējā specifiskā augšanas ātruma (E_rC_x) un ražības (E_yC_x), kurus savukārt nosaka pēc plātnīšu skaita un vēl viena mērāmā lieluma (kopējās plātnīšu platības, saussvara vai svaigsvara). Tā ir tāpēc, ka ir testējamās ķīmiskās vielas, kas plātnīšu skaitu ietekmē citādi nekā citus mērāmos parametrus. Vēlamie toksiskuma rādītāji tāpēc ir četras dažādas EC_x vērtības katram inhibēšanās līmenim x: E_rC_x (plātnīšu skaits); E_rC_x (kopējā plātnīšu platība, saussvars vai svaigsvars); E_yC_x (plātnīšu skaits); un E_yC_x (kopējā plātnīšu platība, saussvars vai svaigsvars).

Statistiskās metodes

60. Mērķis ir regresijas analīzē iegūt kādu kvantitatīvu koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību. Kad atbildreakcijas dati linearizējoši transformēti probita, logita vai Veibula vienībās (13), iespējams izmantot svērtu lineāro regresiju, tomēr priekšroku mēdz dot nelineārām regresijas procedūrām, jo tajās vieglāk tikt galā ar neizbēgamajām datu anomālijām un novirzēm no gludiem sadalījumiem. Ja inhibēšanās vai nu tuvojas nullei, vai ir pilnīga, transformācija var šādas anomālijas samilzināt, jūtami sagrozot analīzes rezultātus (13).

▼M6

Būtu jāatceras, ka analīzes standartmetodes, kurās izmanto probita, logita vai Veibula transformācijas, ir domātas darbam ar binārajiem datiem (piem., izdzīvošanas/neizdzīvošanas datiem) un, lai tās būtu izmantojamas darbam ar augšanas ātruma vai ražības datiem, tās jāmodificē. Īpašas metodes EC_x vērtību noteikšanai no bezpārtraukumu datiem ir izklāstītas (14), (15) un (16) avotā.

61. Lai aplēstu EC_x punktveida vērtības, katram analizējamajam atkarīgajam mainīgajam jāizmanto koncentrācijas–atbildreakcijas sakarība. Ja iespējams, katrai aplēstajai vērtībai jānosaka 95 % ticamības robeža. Iegūto datu atbilstība regresijas modelim jānovērtē grafiski vai statistiski. Regresijas analīze jāveic, izmantojot katrā atsevišķā replikātā iegūtās atbildreakcijas vērtības, nevis apstrādes variantu grupu vidējās vērtības.

62. EC_{50} aplēses un ticamības robežas var noteikt, arī izmantojot lineāro interpolāciju ar "bootstrapping" metodi (17), ja pieejamie regresijas modeļi/metodes nav piemērotas datiem.

63. *LOEC* un tādējādi *NOEC* aplēšanai ir nepieciešams salīdzināt apstrādes replikātu vidējās vērtības, izmantojot dispersijas analīzes *(ANOVA)* metodes. Katras koncentrācijas vidējā vērtība jāsalīdzina ar kontrolgrupas vidējo vērtību, izmantojot atbilstošu multiplās salīdzināšanas vai trenda testa metodi. Iespējams, būs noderīgs Daneta *[Dunnett]* vai Viljamsa *[Williams]* tests (18)(19)(20)(21). Jānovērtē, vai ir spēkā pieņēmums par dispersijas homogenitāti, kas ir *ANOVA* pamatā. Šo novērtējumu var veikt grafiski vai izmantojot formālu testu (22). Piemērots ir Levena *[Levene]* vai Bārtleta *[Bartlett]* tests. Dispersijas homogenitātes pieņēmuma neatbilstību dažkārt var koriģēt, izmantojot datu logaritmisko transformāciju. Ja dispersijas heterogenitāte ir pārlieku liela un to nevar koriģēt ar transformāciju, jāveic analīze ar tādām metodēm kā descendents Džonkhīra *[Jonckheere]* trenda tests. Papildu norādījumus par *NOEC* noteikšanu sk. (16).

64. Jaunākie sasniegumi zinātnē ir bijuši par pamatu ieteikumam atteikties no *NOEC* jēdziena un aizstāt to ar EC_x punktveida vērtību aplēsanu ar regresiju. Šim ūdensziedu testam nav noteikta piemērota x vērtība. Piemērots šķiet diapazons no 10 līdz 20 % (atkarībā no izraudzītā atkarīgā mainīgā), un ieteicams pārskatā iekļaut gan EC_{10}, gan EC_{20}.

Pārskatu sagatavošana

65. Testēšanas pārskatā jāiekļauj turpmāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālās īpašības un fizikālķīmiskās īpašības, tostarp ūdensšķīdības robežas;

— ķīmiskās vielas identifikācijas dati (piemēram, *CAS* numurs), tostarp tīrības pakāpe (piemaisījumi).

Testa suga:

— zinātniskais nosaukums, klons (ja zināms) un izcelsmes avots.

Testa apstākļi:

— izmantotā testēšanas procedūra (statiskā, pusstatiskā vai caurplūdes metode);

— testa sākuma un beigu datums un tā ilgums;

— testēšanas barotne;

— eksperimentālā plāna apraksts: testa trauki un vāki, šķīdumu tilpums, plātnīšu un koloniju skaits katrā testa traukā testa sākumā;

— izraudzītās testējamās koncentrācijas (nominālās un izmērītās, pēc vajadzības) un katra koncentrācijas varianta replikātu skaits;

▼M6

— izejšķīdumu un testa šķīdumu pagatavošanas metodes, tostarp šķīdinātāju vai disperģētājvielu izmantošana;

— temperatūra testēšanas laikā;

— gaismas avots, gaismas intensitāte un homogenitāte;

— pH vērtības testējamiem un kontrolgrupas šķīdumiem;

— testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija un analīzes metode ar attiecīgiem kvalitātes novērtēšanas datiem (analīžu validācijas pētījumi, standartnovirzes vai ticamības robežas);

— metodes plātnīšu skaita un citu mērāmo parametru, piemēram, saussvara, svaigsvara vai plātnīšu kopējās platības noteikšanai;

— visas atkāpes no šīs testa metodes.

Rezultāti:

— neapstrādātie dati: plātnīšu skaits un citi mērāmie parametri katrā testējamā un kontrolgrupas traukā katrā novērošanas vai analīzes reizē,

— katra mērāmā lieluma vidējās vērtības un standartnovirzes;

— augšanas līknes katrai koncentrācijai (ieteicams – ar logaritmiski pārveidotu mērāmo parametru, sk. 55. punktu);

— divkāršošanās laiks / augšanas ātrums kontrolgrupā, kas aprēķināts pēc plātnīšu skaita;

— aprēķinātie atbildreakcijas rādītāji katram apstrādes replikātam, to vidējās vērtības un replikātu variācijas koeficienti;

— koncentrācijas un ietekmes savstarpējās sakarības grafisks attēlojums;

— atkarīgo mainīgo, piemēram, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} toksicitātes aplēstie beigupunkti un ar tiem saistītie ticamības intervāli. *LOEC* un/vai *NOEC*; ja tās ir aprēķinātas, un to noteikšanai izmantotās statistiskās metodes;

— ja ir izmantota *ANOVA*, detektējamais ietekmes apmērs (piemēram, mazākā nozīmīgā atšķirība);

— apstrādes variantos konstatētā augšanas stimulēšana;

— fitotoksiskuma vizuālas pazīmes, kā arī testa šķīdumu novērojumi;

— rezultātu apspriešana, arī ietekme uz testēšanas rezultātiem, kuru rada atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). pp. 733–742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼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 pp.

(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. and 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. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation. 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. US EPA Report No. EPA-600/3–77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and 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. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD. (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application.* Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. *Statist.* 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. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testa metodē izmantotas turpmāk norādītās definīcijas un saīsinājumi.

Biomasa ir populācijas dzīvās vielas saussvars. Šajā testā parasti tiek mērīti arī biomasas aizstājējparametri, piemēram, plātnīšu skaits vai platība, un termina "biomasa" lietojums attiecas arī uz šiem aizstājējparametriem.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

Hloroze ir ūdensziedu plātnīšu dzeltēšana.

Klons ir organisms vai šūna, kas cēlusies no atsevišķa īpatņa bezdzimumvairošanās ceļā. Tāpēc indivīdi, kas cēlušies no viena un tā paša klona, ir ģenētiski identiski.

Kolonija ir savstarpēji saistītu ūdensziedu mātesplātnīšu un meitasplātnīšu (parasti 2–4) kopums. Dažkārt to dēvē par augu.

EC_x ir testēšanas barotnē izšķīdinātas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kuras rezultāts ir ūdensziedu *(Lemna)* augšanas samazinājums par x % (piemēram, 50 %) noteiktā ekspozīcijas periodā (skaidri jānorāda, ja tas atšķiras no pilna vai normāla testa ilguma). Lai nepārprotami norādītu EC vērtību, kas iegūta no augšanas ātruma vai ražības, izmanto simbolu "E_rC" augšanas ātrumam, bet "E_yC" – ražībai, kam seko mērāmais mainīgais parametrs, piemēram, E_rC (plātnīšu skaits).

Caurplūde ir tests, kurā testa šķīdumi pastāvīgi tiek nomainīti.

Plātnīte ir ūdenszieda atsevišķa daļa, kas pēc ārējā izskata ir lapveidīga. Tā ir ūdenszieda mazākā vienība, kas spējīga vairoties, respektīvi, īpatnis.

Kumpainība ir īpašība, kas piemīt ūdenszieda plātnītēm, kuras izskatās kumpainas vai uzpūtušās.

Augšana ir mērāmā parametra vērtības palielināšanās, piemēram, ūdensziedu plātnīšu skaita, saussvara, mitrā svara vai plātnīšu platības palielināšanās testa periodā.

Augšanas ātrums (vidējais specifiskais augšanas ātrums) ir biomasas logaritmisks pieaugums eksponēšanas laikā.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija *(LOEC)* ir zemākā testētā koncentrācija, pie kuras novērotajai ķīmiskajai vielai noteiktā ekspozīcijas laikposmā novēro statistiski nozīmīgu samazinošu ietekmi uz augšanu (pie $p < 0,05$), salīdzinot ar kontrolgrupu. Tomēr visām testa koncentrācijām, kas pārsniedz *LOEC*, jāuzrāda kaitīga ietekme, kura ir vienāda ar vai lielāka par to, kas novērojama pie *LOEC*. Ja ir neiespējami nodrošināt šos abus nosacījumus, jāsniedz izsmeļošs izskaidrojums, kā izraudzīta *LOEC* (un tādējādi *NOEC*).

Mērāmie parametri jeb mainīgie ir jebkuri parametri, kas tiek mērīti, lai izteiktu testēšanas beigupunktu ar vienu vai vairākiem atšķirīgiem atkarīgajiem mainīgajiem. Šajā metodē mērāmie parametri ir ūdensziedu plātnīšu skaits, plātnīšu platība, svaigsvars un saussvars.

Monokultūra ir vienas sugas augu kultūra.

Nekroze ir nedzīvi (t. i., balti vai ūdenī izmirkuši) plātnīšu audi.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija *(NOEC)* ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas ir tieši zem *LOEC* koncentrācijas.

Fenotips ir organisma novērojamo pazīmju kopums, ko nosaka tā gēnu un vides savstarpējā mijiedarbība.

Atkarīgais mainīgais ir mainīgais, ar ko aplēš toksicitāti un ko, izmantojot dažādas aprēķina metodes, iegūst no jebkuriem izmērītajiem parametriem, kuri raksturo biomasu. Šai testa metodei atkarīgie mainīgie ir augšanas ātrums un ražība, kurus iegūst no tādiem mērāmajiem parametriem kā plātnīšu skaits, plātnīšu platība, svaigsvars vai saussvars.

▼M6

Pusstatiskais tests ir tests, kurā testa šķīdumu testa gaitā periodiski maina ar noteiktu regularitāti.

Statiskais tests ir testa metode, kurā šķīdumu testa gaitā nemaina.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Testa beigupunkts ir galvenais faktors, kas mainās testējamās ķīmiskās vielas ietekmē salīdzinājumā ar kontrolgrupu un ko uzzināt ir testēšanas mērķis. Šajā metodē testa beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko var izteikt ar dažādiem atkarīgajiem mainīgajiem, kuru pamatā ir viens vai vairāki mērāmie parametri.

Testēšanas barotne ir pilnīga sintētiska kultūras barotne, kurā aug testa augi, kad tie tiek eksponēti testējamai ķīmiskajai vielai. Testējamo ķīmisko vielu parasti izšķīdina testēšanas barotnē.

Ražība ir mērījuma mainīgā vērtība ekspozīcijas perioda beigās, no kuras atņemta mērījuma mainīgā vērtība ekspozīcijas perioda sākumā, lai izteiktu biomasas pieaugumu testēšanas laikā.

▼M6

2. papildinājums

Ūdensziedu *(Lemna* spp.) apraksts

Ūdensaugi, kurus parasti dēvē par ūdensziediem *(Lemna)*, pieder pie ūdensziedu *(Lemnaceae)* dzimtas, kas ietver četras ģintis ar daudzām pasaulē plaši izplatītām sugām. Šo augu ārējais izskats un taksonomija ir izsmeļoši aprakstīta (1) (2). Kuprainais ūdenszieds *(Lemna gibba)* un mazais ūdenszieds *(L. minor)* ir tipiskas mērenā klimata joslu sugas, un tās bieži izmanto toksiskuma pārbaudēs. Abām sugām raksturīgas ūdenī brīvi peldošas vai iegrimušas diskveida plātnītes ar sīku pavedienveida saknīti katras plātnītes apakšpuses vidusdaļā. Ūdensziedu *(Lemna)* sugām ziedi veidojas reti; šie augi vairojas, veģetatīvi radot jaunas plātnītes (3). Salīdzinājumā ar vecākiem eksemplāriem jaunie augi ir bālāki, ar īsākām saknēm un sastāv no divām vai trim dažādu lielumu plātnītēm. Ūdensziediem raksturīgs mazs izmērs, vienkārša uzbūve, bezdzimumvairošanās un īss paaudžu maiņas laiks, tāpēc šie augi ir ļoti piemēroti laboratorijas testiem (4)(5).

Tā kā jutības starpsugu variācijas ir ļoti varbūtīgas, derīgs ir vienīgi jutības salīdzinājums vienas sugas robežās.

Testēšanai izmantoto ūdensziedu sugu piemēri: sugu norādes

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

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: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (zviedru valodā).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). pp. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Lemna sugu avoti

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanāda, M5S 3 B2
Tālr: +1-416-978-3641
Fakss: +1-416-978-5878
e-pasts: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
ASV
Tālr.: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOKHOLMA
ZVIEDRIJA
Tālr: +46 8 674 7240
Fakss: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlīne
Vācija
E-pasts: lemna@uba.de

LITERATŪRA

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(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. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

3. papildinājums

Izejkultūras uzturēšana

Izejkultūras pazeminātā temperatūrā (4–10 °C) var uzturēt, ilgāku laiku neatjaunojot. Ūdensziedu *(Lemna)* kultivēšanai var izmantot to pašu barotni, ko lieto testēšanai, bet izejkultūrai var lietot citu ar barības vielām bagātu barotni.

Periodiski vairākus jaunus, gaiši zaļas krāsas augus aseptiski pārnes uz kultivēšanas traukiem ar svaigu barotni. Uzglabājot kultūru šeit ieteiktajā pazemātas temperatūras režīmā, pārnešanas intervāls var būt līdz trim mēnešiem.

Jālieto ķīmiski tīri (ar skābi mazgāti) un sterili stikla kultivēšanas trauki, un manipulācijas jāveic aseptiski. Ja izejkultūra ir kontaminēta, piemēram, ar aļģēm vai sēnēm, jāveic pasākumi kontaminējošo organismu likvidēšanai. Aļģes un vairākus citus kontaminējošos organismus iespējams likvidēt, sterilizējot virsmu. Ņem kontaminētā augu materiāla paraugu un nogriež saknītes. Materiālu enerģiski krata tīrā ūdenī, pēc tam iegremdē 0,5 % (tilpumu attiecība *(v/v)*) nātrija hipohlorīta šķīdumā uz laiku no 30 sekundēm līdz 5 minūtēm. Augu materiālu pēc tam skalo ar sterilu ūdeni un vairākās partijās pārvieto kultivēšanas traukos ar svaigu barotni. Daudzas plātnītes šīs apstrādes rezultātā iet bojā, jo īpaši, ja ekspozīcijas periods ir ilgāks, bet izdzīvojušie eksemplāri parasti ir attīrīti no kontaminācijas. Tos var izmantot jaunu kultūru inokulēšanai.

▼**M6**

4. papildinājums

Barotnes

Mazā ūdenszieda *(L. minor)* un kuprainā ūdenszieda *(L. gibba)* kultivēšanai ieteicamas dažādas barotnes. Mazā ūdenszieda kultivēšanai ieteicama modificēta Zviedrijas standartos (SIS) minētā barotne, bet kuprainā ūdenszieda kultivēšanai ieteicama 20X AAP barotne. Abu barotņu sastāvs norādīts tālāk. Sagatavojot šīs barotnes, jāizmanto reaģenta vai analītiskās tīrības pakāpes vielas un dejonizēts ūdens.

Zviedrijas standarta *(Swedish Standard, SIS)* ūdensziedu (*Lemna)* barotne

— Izejšķīdumus I–V sterilizē autoklāvā (120 °C, 15 minūtes) vai ar membrānfiltrāciju (poru izmērs aptuveni 0,2 μm).

— Izejšķīdumu VI (un pēc izvēles VII) sterilizē tikai ar membrānfiltrāciju; tos nedrīkst sterilizēt autoklāvā.

— Sterilie izejšķīdumi jāglabā tumšā, vēsā vietā. Izejšķīdumi I–V derīgi sešus mēnešus, bet izejšķīdumam VI (vai pēc izvēles VII) derīguma termiņš ir viens mēnesis.

Izejšķīdums Nr.	Viela	Koncentrācija izejšķīdumā (g/l)	Koncentrācija gatavajā barotnē (mg/•l)	Gatavā barotne	
				Elements	Koncentrācija (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 . 7H_2O$	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
	$MnCl_2 . 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buferšķīdums)	490	490	—	—

Lai pagatavotu vienu litru SIS barotnes, 900 ml dejonizēta ūdens pievieno izejšķīdumus:

▼**M6**

— 10 ml izejšķīduma I;

— 5 ml izejšķīduma II;

— 5 ml izejšķīduma III;

— 5 ml izejšķīduma IV;

— 1 ml izejšķīduma V;

— 5 ml izejšķīduma VI;

— 1 ml izejšķīduma VII (pēc vajadzības).

Ievērībai: papildu izejšķīdums VII (MOPS buferšķīdums) var būt vajadzīgs dažām testējamajām ķīmiskajām vielām (sk. 11. punktu).

Koriģē pH 6,5 ± 0,2 ar 0,1 M vai 1 M HCl vai NaOH šķīdumu, tilpumu uzpilda līdz vienam litram ar dejonizētu ūdeni.

20X AAP barotne

Izejšķīdumus gatavo sterilā destilētā vai dejonizētā ūdenī.

Sterilie izejšķīdumi jāglabā tumšā vēsā vietā. Šādos apstākļos glabājot, izejšķīdumu derīguma termiņš ir vismaz 6–8 nedēļas.

20X – AAP barotnei gatavo piecus barības vielu izejšķīdumus (A1, A2, A3, B un C), izmantojot ķīmiski tīras vielas. Barotni pagatavo, aptuveni 850 ml dejonizēta ūdens pievienojot 20 ml katra barības vielu izejšķīduma. Koriģē pH 7,5 ± 0,1 ar 0,1 M vai 1 M HCl vai NaOH šķīdumu, tilpumu uzpilda līdz vienam litram ar dejonizētu ūdeni. Barotni filtrē caur 0,2 μm (aptuveni) membrānfiltru sterilā traukā.

Lai stabilizētos, testēšanai izmantojamās barotnes pH, to pagatavo 1–2 dienas pirms lietošanas. Barotnes pH pirms lietošanas jāpārbauda un, ja nepieciešams, noregulē ar 0,1 M vai 1 M HCl vai NaOH šķīdumu, kā minēts iepriekš.

Izejšķīdums Nr.	Viela	Koncentrācija izejšķīdumā (g/l) (*)	Koncentrācija gatavajā barotnē (mg/•l) (*)	Gatavā barotne	
				Elements	Koncentrāci-ja(mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 . 6H_2O$	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	$K_2HPO_4 . 3H_2.O$	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**

Izejšķīdums Nr.	Viela	Koncentrācija izejšķīdumā (g/l) (*)	Koncentrācija gatavajā barotnē (mg/•l) (*)	Gatavā barotne	
				Elements	Koncentrāci-ja(mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	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	7,1 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	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) Ja nav norādīts citādi.

Piezīme: teorētiski piemērotā beigu bikarbonāta koncentrācija (kas novērstu vajadzību koriģēt pH) ir 15 mg/l, nevis 300 mg/l. Tomēr vēsturiskais barotnes 20X-AAP lietojums, kas ir arī šo norādījumu starplaboratoriju testēšanas pamatā, ir 300 mg/l (*I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey.* (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*.)

Steinberga barotne (ISO 20079)

Koncentrācijas un izejšķīdumi

Modificēto Steinberga barotni saskaņā ar ISO 20079 izmanto tikai mazā ūdenszieda kultivēšanai (tā kā pēc šīs metodes atļauta vienīgi mazā ūdenszieda izmantošana), taču testos gūtā pieredze liecina, ka labi rezultāti sasniedzami arī ar kupraino ūdensziedu.

Gatavojot šo barotni, jāizmanto ķīmiski tīras vai analītiski tīras vielas un dejonizēts ūdens.

Barotni gatavo no izejšķīdumiem vai no desmitkārtīgas koncentrācijas barotnes; tā ir barotnes maksimālā koncentrācija, kas iespējama bez vielu izgulsnēšanās.

1 tabula

Steinberga barotne ar stabilizētu pH (modificēta saskaņā ar *Altenburger*)

Komponents		Barotne	
Makroelementi	molekulmasa	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**

Komponents		Barotne	
Mikroelementi	molekulmasa	µg/l	µmol/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
EDTA dinātrija dihidrāts	372,24	1 500,00	4,03

2. tabula.

Izejšķīdumi (makroelementi)

1. Makroelementi (×50 koncentrēti)	**g/l**
1. izejšķīdums:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
2. izejšķīdums:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
3. izejšķīdums:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

3. tabula.

Izejšķīdumi (mikroelementi)

2. Mikroelementi (1 000 koncentrēti)	**mg/l**
4. izejšķīdums:	
H_3BO_3	120,0
5. izejšķīdums:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
6. izejšķīdums:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
7. izejšķīdums:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
8. izejšķīdums:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinātrija dihidrāts	1 500,00

— Vienā šķīdumā var apvienot 2. un 3. izejšķīdumu un atsevišķi 4. līdz 7. (ņemot vērā nepieciešamās koncentrācijas).

▼**M6**

— Ilgākai glabāšanai izejšķīdumus 20 min. sterilizē autoklāvā 121 °C temperatūrā, vai –alternatīvi – izmanto sterilo filtrēšanu (0,2 μm). Ir ļoti ieteicams 8. izejšķīdumu sterilizēt ar filtrēšanu (0,2 μm).

Modificētās Steinberga barotnes pagatavošana galīgajā koncentrācijā

— Aptuveni 900 ml dejonizēta ūdens pievieno pa 20 ml 1., 2. un 3. izejšķīduma (sk. 2. tabulu), lai nenotiktu izgulsnēšanās.

— Pievieno pa 1,0 ml 4., 5., 6., 7. un 8. izejšķīduma (sk. 3. tabulu).

— pH jābūt 5,5 ± 0,2 (to koriģē, pievienojot pēc iespējas mazāku tilpumu NaOH šķīduma vai HCl).

— Uzpilda ar ūdeni līdz 1 000 ml.

— Ja izejšķīdumus sterilizē un tiek lietots piemērots ūdens, gatavā barotne nav jāsterilizē. Ja barotni sterilizē tās galīgajā koncentrācijā, 8. izejšķīdums jāpievieno pēc autoklavēšanas (121 °C, 20 min).

Koncentrētas (×10) modificētās Steinberga barotnes pagatavošana pagaidu glabāšanai

— Aptuveni 30 mililitriem ūdens pievieno pa 20 ml 1., 2. un 3. izejšķīduma (sk. 2. tabulu), lai nenotiktu izgulsnēšanās.

— Pievieno pa 1,0 ml 4., 5., 6. 7. un 8. izejšķīduma (sk. 3. tabulu). Uzpilda ar ūdeni līdz 100 ml.

— Ja izejšķīdumus sterilizē un tiek lietots piemērots ūdens, gatavā barotne nav jāsterilizē. Ja barotni sterilizē tās galīgajā koncentrācijā, 8. izejšķīdums jāpievieno pēc autoklavēšanas (121 °C, 20 min.).

— Barotnes pH (galīgajā koncentrācijā) jābūt 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTUS NOSĒDUMUS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – *TG*) 218 (2004. gads). Šī testēšanas metode ir izstrādāta ietekmes novērtēšanai, kuru izraisa ķīmisko vielu ilgstoša iedarbība uz nosēdumos dzīvojošiem saldūdens divspārņu kārtas kāpuriem *Chironomus* sp. Tās pamatā ir esošie toksicitātes testēšanas protokoli attiecībā uz *Chironomus riparius* un *Chironomus tentans*, kas ir izstrādāti Eiropā (1) (2) (3) un Ziemeļamerikā (4) (5) (6) (7) (8) un kam veikta salīdzinošā izpēte (1) (6) (9). Var izmantot arī citas hironomīdu sugas, piemēram, *Chironomus yoshimatsui*, par ko pieejami detalizēti apraksti (10) (11).

2. Šajā testēšanas metodē izmantotais ekspozīcijas scenārijs paredz nosēdumu piesātināšanu ar testējamo ķīmisko vielu. Atbilstīgā ekspozīcijas scenārija izvēle ir atkarīga no paredzētā testēšanas pielietojuma. Nosēdumu piesātināšanas scenārija mērķis ir imitēt ķīmisko vielu akumulācijas līmeņus nosēdumos. Šī ekspozīcijas sistēma paredz nosēdumu un ūdens testēšanas sistēmas nosēdumu piesātināšanu.

3. Vielas, kas jātestē, lai noskaidrotu to iedarbību uz nosēdumos dzīvojošiem organismiem, parasti nosēdumos pastāv ilgstoši. Nosēdumos dzīvojošie organismi var tikt pakļauti iedarbībai dažādos veidos. Katra ekspozīcijas veida relatīvā nozīme un laiks, kas paiet, lai rastos vispārēja toksiska iedarbība, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar log K_{ow} > 5) vai kas izveido homopolāru saiti ar nosēdumiem, būtisks ekspozīcijas veids var būt piesārņotas barības uzņemšana. Lai nodrošinātu, ka izteikti lipofīlu vielu toksicitāte tiek novērtēta pietiekami precīzi, var apsvērt nosēdumiem pievienotās barības izmantošanu pirms testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas. Lai ņemtu vērā visus iespējamos ekspozīcijas veidus, šī testēšanas metode koncentrējas uz ilgtermiņa ekspozīciju. Testēšana ilgst 20–28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* sugām un 28–65 dienas *C. tentans* sugai. Ja īpašiem nolūkiem ir vajadzīgi īstermiņa dati, piemēram, lai izpētītu nestabilas ķīmiskās vielas ietekmi, pēc 10 dienām var pārtraukt papildu atkārtojumus.

4. Mērītie mērķparametri ir izšķīlušos pieaugušo īpatņu kopējais skaits un izšķilšanās laiks. Ir ieteicams kāpuru izdzīvošanas un augšanas mērījumus veikt tikai pēc 10 dienām, ja ir vajadzīgi papildu īstermiņa dati, pēc vajadzības izmantojot papildu atkārtojumus.

5. Ieteicams izmantot izstrādātus nosēdumus. Izstrādātiem nosēdumiem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar dabīgiem nosēdumiem:

   — tiek samazināta eksperimentālā mainība, jo šādi nosēdumi izveido atkārtojamu "standartizētu matricu" un nav nepieciešams atrast nepiesārņotus un tīrus nosēdumu avotus,

   — testēšanu var sākt jebkurā laikā, nesaskaroties ar sezonālu mainību testēšanas nosēdumos, un nav nepieciešams nosēdumus iepriekš apstrādāt, lai tos attīrītu no vietējās faunas, turklāt izstrādātu nosēdumu izmantošana samazina izmaksas, kas saistītas ar pietiekamu nosēdumu daudzumu savākšanu dabā regulāras testēšanas vajadzībām,

   — izstrādātu nosēdumu izmantošana ļauj salīdzināt toksicitāti un attiecīgi klasificēt vielas.

6. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

▼M4

TESTĒŠANAS PRINCIPS

7. Vispirms hironomīdu kāpurus jebkurā attīstības stadijā pakļauj testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju diapazona iedarbībai nosēdumu un ūdens sistēmās. Nosēdumus piesātina ar testējamo ķīmisko vielu un pēc tam pirmās attīstības stadijas kāpurus ievieto testēšanas vārglāzēs, kurās nostabilizējušās nosēdumu un ūdens koncentrācijas. Hironomīdu izšķilšanos un attīstības ātrumu mēra testēšanas beigās. Kāpuru izdzīvošanu un svaru var noteikt jau pēc 10 dienām, ja vajadzīgs (izmantojot papildu atkārtojumus pēc vajadzības). Šos datus analizē, vai nu izmantojot regresijas modeli, lai aplēstu koncentrāciju, kas izraisītu × % samazinājumu attiecībā uz izšķilšanos vai kāpuru izdzīvošanu vai augšanu (piemēram, EC_{15}, EC_{50} utt.), vai izmantojot statistiskās hipotēzes testu, lai noteiktu koncentrācijas līmeni, pie kura nav novērojama ietekme (*NOEC*) / koncentrācijas līmeni, pie kura novērojama mazākā ietekme (*LOEC*). Statistiskās hipotēzes testam ir nepieciešams salīdzināt ietekmes vērtības ar kontroles vērtībām, izmantojot statistiskus testus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

8. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai ūdenī, tās tvaika spiedienam, izmērītajai vai aprēķinātajai daļai nosēdumos un stabilitātei ūdenī un nosēdumos. Jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar ko būtu iespējams kvantificēt testējamo ķīmisko vielu ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos ar zināmu un apstiprinātu precizitāti un noteikšanas ierobežojumu. Lietderīga informācija ietver testējamās ķīmiskās vielas struktūrformulu un tīrību. Tāpat lietderīgi ir zināt testējamās vielas ķīmisko sadalīšanos (piemēram, izkliedēšanās, abiotiskā un biotiskā noārdīšanās utt.). Papildu norādījumi par tādu vielu testēšanu, kuras ir sarežģīti testēt to fizikālo un ķīmisko īpašību dēļ, pieejami atsaucē (12).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

9. Periodiski var testēt ķīmiskās standartvielas, lai pārliecinātos, ka testēšanas protokols un apstākļi ir uzticami. Toksisko standartvielu, kas sekmīgi izmantotas salīdzinošajos testos un validēšanas pētījumos, piemēri ietver lindānu, trifluralīnu, pentahlorfenolu, kadmija hlorīdu un kālija hlorīdu (1) (2) (5) (6) (13).

TESTA DERĪGUMS

10. Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— izšķilšanās apmēram kontroles traukos jābūt vismaz 70 % testēšanas beigās (1) (6),

— *C. riparius* un *C. yoshimatsui* izšķilšanās līdz pieaugušiem īpatņiem no kontroles traukiem jānotiek 12–23 dienu laikā pēc to ievietošanas traukos; *C. tentans* ir vajadzīgas 20–65 dienas,

— testēšanas beigās katrā traukā jānosaka pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija; skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (turpmāk – *ASV*) izmantotajā temperatūrā, savukārt pH ūdens virsējā slānī jābūt 6–9 diapazonā visos testēšanas traukos,

— ūdens temperatūra nedrīkstētu atšķirties vairāk kā par ± 1,0 °C; ūdens temperatūru varētu kontrolēt ar izotermisku telpu, un tādā gadījumā temperatūra telpā ir jāapstiprina atbilstīgos laika intervālos.

▼M4

METODES APRAKSTS

Testēšanas trauki

11. Pētījumu veic 600 ml stikla vārglāzēs ar 8 cm diametru. Der arī citi trauki, bet tiem jānodrošina piemērots ūdens virsējā slāņa un nosēdumu dziļums. Nosēdumu virsmai jābūt pietiekamai, lai nodrošinātu 2–3 cm^2 telpu katram kāpuram. Nosēdumu slāņa dziļuma attiecībai pret ūdens virsējā slāņa dziļumu jābūt 1:4. Testēšanas traukiem un citām iekārtām, kas saskarsies ar testēšanas sistēmu, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla (piemēram, teflona).

Sugu izvēle

12. Testēšanā vēlams izmantot sugu *Chironomus riparius*. Arī *Chironomus tentans* ir piemēroti, bet grūtāk apstrādājami, un tiem vajadzīgs ilgāks testēšanas periods. Var izmantot arī *Chironomus yohimatsui*. Sīka informācija par kultūru metodēm attiecībā uz *Chironomus riparius* ir sniegta 2. papildinājumā. Informācija par kultūras apstākļiem ir pieejama arī attiecībā uz citām sugām, t. i., *Chironomus tentans* (4) un *Chironomus yoshimatsui* (11). Sugu noteikšana ir jāapstiprina pirms testēšanas, bet nav vajadzīga pirms katras testēšanas reizes, ja organismi ir iegūti no laboratorijā kultivētas kultūras.

Nosēdumi

13. Vēlams izmantot izstrādātus nosēdumus (saukti arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem nosēdumiem). Tomēr, ja izmanto dabīgos nosēdumus, tie ir jāraksturo (vismaz pH, organiskā oglekļa sastāvs, ieteicama arī tādu citu parametru noteikšana kā C/N attiecība un granulometrija) un tajos nedrīkstētu būt nekāda piesārņojuma un citu organismu, kas varētu konkurēt ar hironomīdiem vai baroties ar tiem. Ieteicams arī pirms izmantošanas hironomīdu toksicitātes testā dabīgos nosēdumus kondicionēt septiņasS dienas tādos pašos apstākļos, kādi pastāvēs testēšanas laikā. Šajā testā (1) (15) (16) ir ieteicams izmantot šādus izstrādātus nosēdumus, par pamatu izmantojot mākslīgu augsni, ko izmanto C.8. testēšanas metodē (14):

a) 4–5 % (saussvars) kūdras – pēc iespējas pietuvināta pH 5,5–6,0 apmērā; ir svarīgi izmantot pulverizētu kūdru, kas smalki samalta (daļiņu izmērs ≤ 1 mm) un kas ir izžāvēta vienīgi ar gaisu;

b) 20 % (saussvars) kaolīna mālu (kaolinīta saturam vēlams būt virs 30 %);

c) 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (pārsvarā tām jāsastāv no smalkām smiltīm, proti, vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm izmērā);

d) pievieno dejonizētu ūdeni, lai iegūtu galīgā maisījuma mitruma saturu 30–50 % diapazonā;

e) pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu ($CaCO_3$), lai koriģētu galīgā nosēdumu maisījuma pH 7,0 ± 0,5 apmērā; galīgā maisījuma organiskā oglekļa saturam jābūt 2 % (± 0,5), un tas jākoriģē, izmantojot atbilstīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu.

14. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu un smilšu avotam. Nosēdumu sastāvdaļas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tajās nav ķīmiska piesārņojuma (piemēram, smago metālu, hlororganisko savienojumu, fosfororganisko savienojumu utt.). Izstrādātu nosēdumu sagatavošanas piemērs ir aprakstīts 3. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja tiek pierādīts, ka pēc ūdens virsējā slāņa pievienošanas nenotiek nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās (piemēram, kūdras daļiņu peldēšana pa ūdens virsmu) un ka kūdra vai nosēdumi ir pietiekami kondicionēti.

▼M4

Ūdens

15. Jebkurš ūdens, kas atbilst 2. un 4. papildinājumā noteiktajiem pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots kā testēšanas ūdens. Jebkāds piemērots ūdens, proti, dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens (sk. 2. papildinājumu) vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams kā kultūras turēšanas un testēšanas ūdens, ja hironomīdi tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas un testēšanas laikā. Testēšanas sākumā testēšanas ūdens pH jābūt 6–9 diapazonā, savukārt kopējā cietība nedrīkst pārsniegt 400 mg/l kā $CaCO_3$. Tomēr, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4). Visa pētījuma laikā jāizmanto viena veida ūdens. Ūdens kvalitātes raksturlielumi, kas uzskaitīti 4. papildinājumā, jānosaka vismaz divreiz gadā vai tad, kad ir aizdomas, ka šie raksturlielumi varētu būt būtiski izmainījušies.

Rezerves šķīdumi – piesātināti nosēdumi

16. Izraudzītās koncentrācijas piesātinātos nosēdumus parasti sagatavo, testējamās vielas šķīdumu tieši pievienojot nosēdumiem. Dejonizētā ūdenī izšķīdinātas testējamās vielas rezerves šķīdumu samaisa ar izstrādātajiem nosēdumiem, izmantojot velmēšanas dzirnavas, barības jaucēju vai manuālu jaukšanu. Ja testējamā viela ir ūdenī mazšķīstoša, to var izšķīdināt pēc iespējas mazākā tilpumā piemērota organiska šķīdinātāja (piemēram, heksāna, acetona vai hloroforma). Šo šķīdumu pēc tam samaisa ar 10 g smalku kvarca smilšu katram testēšanas traukam. Šķīdumam ļauj iztvaikot, un tam ir pilnībā jāpazūd no smiltīm. Pēc tam smiltis samaisa ar piemērotu daudzumu nosēdumu katrā testēšanas vārglāzē. Testējamās vielas šķīdināšanai, disperģēšanai vai emulģēšanai drīkst izmantot tikai tādus preparātus, kas viegli izgaist. Jāpatur prātā, ka testējamās vielas nodrošinātās smiltis un smilšu maisījums ir jāņem vērā, sagatavojot nosēdumus (t. i., tādēļ nosēdumi ir jāsagatavo, izmantojot mazāk smilšu). Jāuzmanās, lai nodrošinātu, ka nosēdumiem pievienotā testējamā viela ir nosēdumos viscaur un vienmērīgi izkliedēta. Ja vajadzīgs, var analizēt paraugus, lai noteiktu homogenitātes pakāpi.

TESTĒŠANAS PLĀNS

17. Testēšanas plāns attiecas uz testēšanas koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, trauku skaitu katram koncentrācijas līmenim un kāpuru skaitu traukā. Ir aprakstīti plāni ietekmes koncentrāciju (turpmāk – *EC*) punktu noteikšanai, *NOEC* noteikšanai un pieļaujamā daudzuma testēšanas veikšanai.

Regresijas analīzes plāns

18. Testēšanā izmantotajām koncentrācijām ir jāaptver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{15}, EC_{50}) un koncentrāciju diapazons, kurā ir jānoskaidro testējamās vielas ietekme. Tas, ka ietekmes koncentrācija ir testēšanā izmantoto koncentrāciju diapazonā, parasti uzlabo ietekmes koncentrāciju (EC_x) noteikšanas precizitāti un it sevišķi derīgumu. Jāizvairās no ekstrapolācijas krietni zem zemākās pozitīvās koncentrācijas vai virs augstākās koncentrācijas. Ir lietderīgi veikt orientējošu diapazona noteikšanas testēšanu, lai izvēlētos izmantojamo koncentrāciju diapazonu (sk. 27. punktu).

▼M4

19. Ja ir jānosaka EC_x, jātestē vismaz piecas koncentrācijas un trīs atkārtojumi katrai koncentrācijai. Jebkurā gadījumā ieteicams izmantot pietiekamu daudzumu testēšanas koncentrāciju, lai nodrošinātu modeli pamatotām aplēsēm. Koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2 (izņēmums varētu būt gadījumi, kad devu un atbildes reakcijas līknei ir sekls slīpums). Katras apstrādes atkārtojumu skaitu var samazināt, ja palielina testēšanas koncentrāciju skaitu ar dažādām atbildes reakcijām. Atkārtojumu skaita palielināšana vai testēšanas koncentrāciju intervālu samazināšana parasti noved pie šaurākiem testēšanas ticamības intervāliem. Ir vajadzīgi papildu atkārtojumi, ja kāpuru izdzīvošanu un augšanu nosaka jau pēc 10 dienām.

***NOEC*/*LOEC* noteikšanas plāns**

20. Ja ir jānosaka *LOEC* vai *NOEC*, jāizmanto [iecas testēšanas koncentrācijas ar vismaz četreim atkārtojumiem un koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2. Atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu statistisko nozīmību un varētu konstatēt 20 % atšķirību no kontroles traukiem pie 5 % nozīmības līmeņa (p = 0,05). Attiecībā uz attīstības ātrumu parasti ir piemēroti veikt dispersijas analīzi (turpmāk – *ANOVA*), piemēram, *Dunnett* testu vai *Williams* testu (17) (18) (19) (20). Attiecībā uz izšķilšanās koeficientu var izmantot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieeju (ar *Bonferroni* korekciju) vai *Mantel-Haenszel* testu.

Pieļaujamā daudzuma tests

21. Pieļaujamā daudzuma testu (1 testēšanas koncentrācija un kontroles trauks) var veikt, ja orientējošā diapazona noteikšanas testā netika konstatēta ietekme. Pieļaujamā daudzuma testa mērķis ir veikt testēšanu ar pietiekami augstu koncentrāciju, lai lēmumu pieņēmēji varētu izslēgt testējamās vielas iespējamu toksisku ietekmi, un pieļaujamo daudzumu nosaka tādā koncentrācijā, kādas iestāšanos neprognozē nekādā gadījumā. Ieteicams 1 000 mg/kg (saussvars). Parasti ir vajadzīgi vismaz seši atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Ir jāpanāk pietiekama statistiskā nozīmība, lai varētu noteikt 20 % atšķirību no kontroles trauka pie 5 % nozīmības līmeņa (p = 0,05). Ar metrisku atbildes reakciju (attīstības ātrums un svars) t-tests parasti ir piemērota statistiskā metode, ja dati atbilst šā testa prasībām (normalitāte, homogēnas dispersijas). Var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testu vai ar parametriem nesaistītu testu, piemēram, *Wilcoxon-Mann-Whithey* testu, ja nav atbilstības iepriekš norādītajām prasībām. Attiecībā uz izšķilšanās koeficientu ir piemērota *Fisher* pieeja.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Piesātinātās nosēdumu un ūdens sistēmas sagatavošana

22. Testējamās vielas pievienošanai ir ieteicams izmantot testēšanas C.8. metodē "Toksicitātes noteikšana sliekām" aprakstīto piesātināšanas procedūru (14). Piesātinātos nosēdumus ievieto traukos un pievieno ūdens virsējo slāni, lai izveidotu nosēdumu un ūdens tilpuma attiecību 1:4 (sk. 11. un 15. punktu). Nosēdumu slāņa dziļumam jābūt 1,5–3 cm. Lai izvairītos no nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās un smalku daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens stabā testēšanas ūdens pievienošanas laikā, nosēdumus var pārklāt ar plastmasas ripu ūdens uzliešanas laikā, bet pēc tam ripu nekavējoties noņem. Šim nolūkam der arī citas ierīces.

23. Testēšanas trauki ir jāapsedz (piemēram, ar stikla plāksnēm). Ja vajadzīgs, pētījuma laikā ūdens līmeņus papildina līdz sākotnējam tilpumam, lai kompensētu ūdens iztvaikošanu. Tam jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, lai novērstu sāļu uzkrāšanos.

▼M4

Stabilizācija

24. Tiklīdz ir sagatavoti piesātinātie nosēdumi ar ūdens virsējo slāni, ir vēlams ļaut testējamai vielai nodalīties no ūdens fāzes un nogulsnēties uz nosēdumiem (3) (4) (6) (13). To vēlams īstenot tādos pašos temperatūras un aerācijas apstākļos, kādus izmanto testēšanā. Atbilstīgais līdzsvara iestāšanās laiks ir atkarīgs no konkrētajiem nosēdumiem un ķīmiskās vielas un var būt stundas vai dienas un retos gadījumos ilgt līdz pat vairākām nedēļām (4–5 nedēļas). Tā kā šajā laikā varētu noārdīties daudzas ķīmiskās vielas, līdzsvara iestāšanās netiek gaidīta, bet līdzsvarošanai ir ieteicams dot 48 stundas. Šā turpmākas līdzsvarošanās perioda beigās ir jānosaka testējamās vielas koncentrācija ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos, proti, vismaz augstākā un zemākā koncentrācija (sk. 38. punktu). Šie testējamās vielas analītiskie mērījumi ļauj aprēķināt masas bilanci un noteikt rezultātus, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām.

Testēšanas organismu pievienošana

25. Četras līdz piecas dienas pirms testa organismu pievienošanas testēšanas traukos no kultūrām jāizņem oliņas un tās jāievieto nelielos traukos ar audzēšanas barotni. Var izmantot noturētu barotni no rezerves kultūras vai svaigi sagatavotu barotni. Ja izmanto svaigi sagatavotu barotni, kultūras barotnei jāpievieno neliels daudzums barības, piemēram, zaļaļģes un/vai daži pilieni filtrāta no smalki samaltas zivju barības pārslu suspensijas (sk. 2. papildinājumu). Jāizmanto tikai svaigi izdētas oliņas. Parasti kāpuri sāk šķilties dažas dienas pēc oliņu izdēšanas (2–3 dienas *Chironomus riparius* 20 °C un 1–4 dienas *Chironomus tentans* 23 °C un *Chironomus yoshimatui* 25 °C), un kāpuru augšana notiek četrās attīstības stadijās, no kurām katra ilgst 4–8 dienas. Testēšanā jāizmanto pirmās attīstības stadijas kāpuri (2–3 vai 1–4 dienas pēc izšķilšanās). Knišļu attīstības stadiju var pārbaudīt, izmantojot galvas kapsulas platumu (6).

26. Katrā testēšanas traukā ar piesātinātiem nosēdumiem un ūdeni pēc nejaušības principa ievieto 20 pirmās attīstības stadijas kāpurus, izmantojot neasu pipeti. Kāpuru ievietošanas laikā testēšanas traukos ir jāpārtrauc ūdens aerācija, un šis pārtraukums jāturpina vēl 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas (sk. 25. un 32. punktu). Saskaņā ar izmantoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu) izmantoto kāpuru skaits uz katru koncentrāciju ir vismaz 60, lai noteiktu *EC* punktus, un 80, lai noteiktu *NOEC*.

Testēšanas koncentrācijas

27. Diapazona noteikšanas tests varētu būt lietderīgs, lai noteiktu koncentrāciju diapazonu galīgajam testam. Šim nolūkam izmanto virkni atšķirīgu testējamās vielas koncentrāciju. Lai hironomīdiem nodrošinātu tādu pašu virsmas blīvumu, kādu izmantos galīgajā testēšanā, hironomīdus pakļauj katras testējamās vielas koncentrācijas iedarbībai uz tādu laiku, kas ļauj aplēst aptuvenās testēšanas koncentrācijas. Atkārtojumi nav vajadzīgi.

28. Lēmumu par testēšanas koncentrācijām galīgajam testam pieņem, pamatojoties uz diapazona noteikšanas testa rezultātiem. Jāizmanto un saskaņā ar 18.–20. punktu jāizvēlas vismaz piecas koncentrācijas.

▼M4

Kontroles trauki

29. Testā ir jāietver kontroles trauki, kuros nav testējamās vielas, bet ir nosēdumi un kuriem nodrošina atbilstīgu skaitu atkārtojumu (sk. 19. un 20. punktu). Ja testējamās vielas pievienošanai ir izmantots šķīdums (sk. 16. punktu), jāizmanto arī nosēdumu šķīduma kontroles trauks.

Testēšanas sistēma

30. Izmanto statiskas sistēmas. Izņēmuma gadījumos, piemēram, ja ūdens kvalitātes specifikācijas nav piemērotas testa organismam vai ietekmē ķīmisko līdzsvaru (piemēram, izšķīdušā skābekļa līmeņi pārmērīgi pazeminās, izvadproduktu koncentrācija pārmēru paaugstinās vai no nosēdumiem ekstrahējas minerāli un ietekmē pH un/vai ūdens cietību), var izmantot daļēji statiskas vai caurplūdes sistēmas ar ūdens virsējā slāņa periodisku vai nepārtrauktu atjaunošanu. Tomēr parasti derēs un ir ieteicamas citas ūdens virsējā slāņa kvalitātes uzlabošanas metodes, piemēram, aerācija.

Barība

31. Kāpuri ir jābaro, vēlams, katru dienu vai vismaz trīs reizes nedēļā. Katram jaunam kāpuram pirmās 10 dienas pietiek ar zivju barību (suspensija ūdenī vai smalki samalta barība, piemēram, *TetraMin* vai *TetraPhyll*, sk. 2. papildinājumu) 0,25–0,5 mg apmērā (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui*). Nedaudz vairāk barības varētu vajadzēt vecākiem kāpuriem, proti, 0,5–1 mg uz kāpuru dienā, ar ko vajadzētu pietikt līdz testēšanas beigām. Ja tiek novērota sēnīšu augšana vai ja kontroles traukos ir novērota mirstība, barības porcija ir jāsamazina visos apstrādes traukos un kontroles traukos. Ja sēnīšu vairošanos neizdodas apturēt, tests ir jāatkārto. Ja tiek testētas vielas, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar log K_{ow} > 5) vai kas izveido homopolāru saiti ar nosēdumiem, barības daudzumu, kurš vajadzīgs organismu izdzīvošanas un dabīgas augšanas nodrošināšanai, var pievienot izstrādātajiem nosēdumiem pirms stabilizācijas perioda. Šādam nolūkam jāizmanto augu materiāls, nevis zivju barība, proti, var pievienot 0,5 % (saussvars) smalki samaltas lapas, piemēram, nātres (*Urtica dioica*), zīdkoka (*Morus alba*), baltā āboliņa (*Trifolium repens*) vai spinātu (*Spinacia oleracea*) lapas, vai citu augu materiālu (*Cerophyl* vai alfa-celulozi).

Inkubācijas apstākļi

32. Kad ir pagājušas, vēlams, 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas, testēšanas traukos ūdens virsējam slānim nodrošina lēnu aerāciju, ko turpina visā testēšanas laikā (jāuzmanās, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nepazeminās zem 60 % no *ASV*). Aerāciju nodrošina caur stikla Pastēra pipeti, kas piestiprināta 2–3 cm virs nosēdumu slāņa (t. i., vienu vai dažus burbuļus sekundē). Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, var apsvērt iespēju nosēdumu un ūdens sistēmai aerāciju nenodrošināt.

33. Testēšanu veic nemainīgā 20 °C (± 2 °C) temperatūrā. *C. tentans* un *C. yoshimatui* ieteicamā temperatūra ir attiecīgi 23 °C un 25 °C (± 2 °C). Piemēro 16 stundu apgaismojuma ilgumu, un gaismas intensitātei jābūt 500–1 000 luksiem.

▼M4

Ekspozīcijas ilgums

34. Ekspozīcija sākas brīdī, kad kāpuri tiek ielaisti piesātinātajos un kontroles traukos. Maksimālais ekspozīcijas ilgums ir 28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* un 65 dienas *C. tentans*. Ja knišļi izšķiļas ātrāk, testēšanu var pārtraukt ne mazāk kā pēc piecām dienām pēc pēdējā pieaugušā īpatņa izšķilšanās kontroles traukā.

Novērojumi

Izšķilšanās

35. Nosaka pilnībā izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu attīstības laiku un kopējo skaitu. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

36. Testēšanas trauki ir jānovēro vismaz trīs reizes nedēļā, lai vizuāli novērtētu jebkādas anomālijas (piemēram, nosēdumu pamešana, neparasta peldēšana) salīdzinājumā ar kontroles traukiem. Paredzamās izšķilšanās periodā katru dienu jāskaita izšķīlušies knišļi. Katru dienu reģistrē pilnībā izšķīlušos knišļu dzimumu un skaitu. Pēc identificēšanas knišļus izņem no traukiem. Oliņas, kas izdētas pirms testēšanas pabeigšanas, ir jāreģistrē un jāizņem, lai novērstu kāpuru atjaunošanos nosēdumos. Jāreģistrē arī redzamo kūniņu skaits, kuras nav izšķīlušās. Norādījumi par izšķilšanās mērīšanu ir sniegti 5. papildinājumā.

Augšana un izdzīvošana

37. Ja ir jāsniedz dati par kāpuru izdzīvošanu un augšanu pēc 10 dienām, sākumā jāietver papildu testēšanas trauki, lai tos varētu izmantot šim nolūkam. Šo papildu trauku nosēdumus izkāš, izmantojot 250 μm sietu, lai saglabātu kāpurus. Nāves kritēriji ir nekustīgums vai atbildes reakcijas trūkums uz mehānisku kairinājumu. Neatgūtie kāpuri arī jāuzskata par mirušiem (kāpurus, kas nomiruši testēšanas sākumā, iespējams, ir noārdījuši mikrobi). Nosaka izdzīvojušo kāpuru saussvaru (bez pelniem) katrā testēšanas traukā un aprēķina vidējo atsevišķo saussvaru katrā traukā. Ir lietderīgi noteikt, kurai attīstības stadijai pieder izdzīvojušais kāpurs. Šim nolūkam var izmantot katra īpatņa galvas kapsulas platuma mērījumu.

Analītiskie mērījumi

Testējamās vielas koncentrācija

38. Pirms testēšanas sākšanas (t. i., pirms kāpuru ielaišanas) vismaz no viena katras koncentrācijas trauka paņem nosēdumu kopējos paraugus, lai analītiski noteiktu testējamās vielas koncentrāciju nosēdumos. Ir ieteicams testēšanas sākumā (sk. 24. punktu) un beigās analizēt vismaz ūdens virsējā slāņa, porūdens un nosēdumu paraugus no augstākās un zemākās koncentrācijas. Šāda testējamās vielas koncentrācijas noteikšana sniedz informāciju par testējamās vielas attīstību/sadalīšanos ūdens un nosēdumu sistēmā.

39. Ja veic starpposma mērījumus (piemēram, septītajā dienā) un ja analīzei ir vajadzīgi lieli paraugi, ko nevar paņemt no testēšanas traukiem, neietekmējot testēšanas sistēmu, jāveic analītiska noteikšana no paraugiem, kuri ņemti no papildu testēšanas traukiem, kas saņēmuši tādu pašu apstrādi (ietverot testa organismus), bet netiek izmantoti bioloģiskajiem novērojumiem.

▼M4

40. Lai izolētu starpūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g 4 °C temperatūrā 30 minūtes. Tomēr, ja tiek pierādīts, ka testējamā viela neadsorbējas uz filtriem, var būt pieņemami izmantot arī filtrēšanu. Dažos gadījumos var būt neiespējami analizēt koncentrācijas porūdenī, jo parauga izmērs ir pārāk mazs.

Fizikālie un ķīmiskie parametri

41. Atbilstīgi ir jānosaka testēšanas trauku pH un temperatūra (sk. 10. punktu). Testēšanas sākumā un beigās jānosaka arī cietība un amonjaks kontroles traukos un vienā testēšanas traukā ar augstāko koncentrāciju.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Šā testa mērķis ir noteikt testējamās vielas ietekmi uz attīstības ātrumu un pilnībā izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu kopējo skaitu vai – 10 dienu testa gadījumā – ietekmi uz kāpuru izdzīvošanu un svaru. Ja nav nekādu norāžu par statistiski atšķirīgu jutību atkarībā no dzimuma, tēviņu un mātīšu rezultātus var apvienot, lai veiktu statistisko analīzi. Jutības atšķirības starp dzimumiem var statistiski novērtēt, piemēram, ar χ^2 – r × 2 testu. Ja vajadzīgs, pēc 10 dienām ir jānosaka kāpuru izdzīvošana un vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā.

43. Ietekmes koncentrācijas, kas izteiktas saussvarā un pamatotas uz to, vēlams aprēķināt, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām nosēdumos testēšanas sākumā (sk. 38. punktu).

44. Lai aprēķinātu punktu aplēsi EC_{50} vai jebkurai citai EC_x, kā patiesus atkārtojumus var izmantot statistiku par situāciju pirms ievietošanas traukos. Aprēķinot ticamības intervālu jebkurai EC_x, jāņem vērā mainība starp traukiem vai ir jāpierāda, ka šī mainība ir tik maza, ka to var neņemt vērā. Ja modeli aprīko saskaņā ar mazāko kvadrātu metodi, statistika par situāciju pirms ievietošanas traukos ir jākoriģē, lai uzlabotu mainības homogenitāti. Tomēr EC_x vērtības ir jāaprēķina pēc tam, kad atbildes reakcija ir atkoriģēta atpakaļ uz sākotnējo vērtību.

45. Ja statistiskās analīzes mērķis ir noteikt *NOEC*/*LOEC* ar hipotēzes testu, jāņem vērā mainība starp traukiem, piemēram, ar ieligzdotu *ANOVA*. Var arī izmantot stabilākus testus (21) situācijās, kad ir pārkāpti parastie *ANOVA* pieņēmumi.

Izšķilšanās koeficients

46. Izšķilšanās koeficienti ir kvantitatīvi dati, ko var analizēt ar *Cochran-Armitage* testu, kuru īsteno pakāpeniski, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja šie dati atbilst šādai prognozei. Ja minētais tests analīzei neder, var izmantot *Fisher* pieeju vai *Mantel-Haenszel* testu ar *Bonferroni-Holm* koriģētajām p-vērtībām. Ja pastāv liecības par lielāku mainību starp atkārtojumiem ar vienu un to pašu koncentrāciju, nekā to norādītu binomināls sadalījums (nereti uz to atsaucas kā uz "papildu binomināl" mainību), tad jāizmanto stabils *Cochran-Armitage* vai *Fisher* pieejas tests, kā ierosināts atsaucē (21).

▼M4

Nosaka katrā traukā izšķīlušos knišļu summu (n_e), ko dala ar ielaisto kāpuru skaitu (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kur:

ER = izšķilšanās koeficients;

n_e = katrā traukā izšķīlušos knišļu skaits;

n_a = katrā traukā ielaisto kāpuru skaits.

47. Lieliem paraugu apjomiem piemērota alternatīva, ja pastāv papildu binomināla mainība, ir iespēja izšķilšanās koeficientu uzskatīt par nepārtrauktu atbildes reakciju un izmantot tādas procedūras kā *William* tests, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja tas atbilst šiem izšķilšanās koeficienta datiem. *Dunnett* tests būtu piemērots, ja monotonuma nav. Šajā kontekstā liels parauga apjoms tiek definēts kā gadījums, kad gan izšķīlušos īpatņu skaits, gan neizšķīlušos īpatņu skaits pārsniedz piecus katrā atkārtojumā (traukā).

48. Lai piemērotu *ANOVA* metodes, izšķilšanās koeficienta vērtības ir vispirms jāpārvērš ar *arcsin* kvadrātsaknes transformāciju vai ar *Freeman-Tukey* transformāciju, lai iegūtu aptuveno normālo sadalījumu un izlīdzinātu mainības. Izmantojot absolūto periodiskumu, var piemērot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieejas (*Bonferroni*) vai *Mantel-Haenszel* testus. *Arcsin* kvadrātsaknes transformāciju piemēro, ņemot izšķilšanās koeficienta kvadrātsaknes inverso sinusu ($\sin^{-1}$).

49. Izšķilšanās koeficientiem EC_x vērtības aprēķina, izmantojot regresijas analīzi (vai, piemēram, *probit* (22), *logit*, *Weibull*, atbilstīgu tirdzniecībā pieejamu programmatūru utt.). Ja regresijas analīze ir nesekmīga (piemēram, tiek iegūtas mazāk nekā divas daļējas atbildes reakcijas), izmanto citas ar parametriem nesaistītas metodes, tādas kā slīdošā vidējā vai vienkāršā interpolācija.

Attīstības ātrums

50. Vidējais attīstības laiks ir vidējais laikposms starp kāpuru ielaišanu (testa 0. diena) un testa knišļu izšķilšanos. (Lai aprēķinātu patieso attīstības laiku, jāapsver kāpuru vecums ielaišanas brīdī.) Attīstības ātrums ir attīstības laika apgrieztā vērtība (vienība: 1/diena) un ir kāpuru vienas dienas attīstības daļa. Attīstības ātrums ir ieteicamāks, lai novērtētu šos nosēdumu toksicitātes pētījumus, jo tā mainība ir mazāka un tas ir homogēnāks un tuvāks normālam sadalījumam salīdzinājumā ar attīstības laiku. Tādējādi efektīvas parametru testēšanas procedūras var izmantot drīzāk ar attīstības ātrumu, nevis ar attīstības laiku. Attiecībā uz attīstības ātrumu kā nepārtrauktu atbildes reakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot regresijas analīzi (piemēram, (23) (24)).

51. Turpmākajiem statistiskajiem testiem pieņem, ka pārbaudes dienā × novēroto knišļu skaits ir izšķīlies vidējā laika intervālā starp dienu × un dienu x – l (l = pārbaudes intervāla ilgums, parasti viena diena). Katrā traukā vidējo attīstības ātrumu (x) aprēķina šādi:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kur:

$\bar{x}$: vidējais attīstības ātrums katrā traukā;

i: pārbaudes intervāla indekss;

m: pārbaudes intervālu maksimālais skaits;

f_i: pārbaudes intervālā i izšķīlušos knišļu skaits;

n_e: kopējais knišļu skaits, kas izšķīlušies eksperimenta beigās; ($= \sum f_i$)

x_i: intervālā i izšķīlušos knišļu attīstības ātrums.

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

kur:

day_i: pārbaudes diena (dienas kopš ielaišanas);

l_i: pārbaudes intervāla i ilgums (dienas, parasti viena diena).

Testēšanas pārskats

52. Testēšanas pārskatā jāietver vismaz šāda informācija:

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības (šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, sadalīšanās koeficients augsnē (vai nosēdumos, ja pieejams), stabilitāte ūdenī utt.),

— ķīmiskās identifikācijas dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, *CAS* numurs utt.), ietverot tīrību un analītisko metodi, ar ko ir iespējams kvantificēt testējamo vielu.

Testēšanas sugas:

— izmantotie testa dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu avots un pavairošanas apstākļi,

— informācija par oliņu un kāpuru apstrādi,

— testa dzīvnieku vecums ielaišanas brīdī testēšanas traukos.

Testēšanas apstākļi:

— izmantotie nosēdumi, t. i., dabīgi vai izstrādāti nosēdumi,

— dabīgajiem nosēdumiem – nosēdumu paraugu ņemšanas vietas atrašanās vieta un apraksts, ietverot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi; raksturlielumi – pH, organiskā oglekļa saturs, C/N attiecība un granulometrija (ja vajadzīgs),

— izstrādāto nosēdumu sagatavošana: sastāvdaļas un raksturlielumi (organiskā oglekļa saturs, pH, mitrums utt. testēšanas sākumā),

— testēšanas ūdens sagatavošana (ja izmanto rekonstituētu ūdeni) un raksturlielumi (skābekļa koncentrācija, pH, vadītspēja, cietība utt. testēšanas sākumā),

— nosēdumu un ūdens virsējā slāņa dziļums,

— ūdens virsējā slāņa un porūdens tilpums; mitru nosēdumu svars ar porūdeni un bez tā;

▼M4

— testēšanas trauki (materiāls un izmērs),

— nosēdumu piesātināšanas metode: izmantotās testēšanas koncentrācijas, atkārtojumu skaits un šķīdums, ja tas izmantots,

— piesātinātās nosēdumu un ūdens sistēmas stabilizēšanās līdzsvara fāze: ilgums un apstākļi,

— inkubācijas apstākļi: temperatūra, apgaismojuma cikls un intensitāte, aerācija (regularitāte un intensitāte),

— sīka informācija par barošanu, arī par barības veidu, sagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu.

Rezultāti:

— testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērītās testēšanas koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju testēšanas traukā,

— ūdens kvalitāte testēšanas traukos, t. i., pH, temperatūra, izšķīdušais skābeklis, cietība un amonjaks,

— iztvaikojušā testēšanas ūdens aizvietošana, ja tā veikta,

— izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu skaits katrā traukā un katru dienu,

— to kāpuru skaits katrā traukā, kas neizšķīlās par knišļiem,

— kāpuru vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā un katrā attīstības stadijā, ja vajadzīgs,

— izšķilšanās īpatsvars katrā atkārtojumā un testēšanas koncentrācijā (knišļu tēviņu un mātīšu datus apvieno),

— pilnībā izšķīlušos knišļu vidējais attīstības ātrums katrā atkārtojumā un apstrādes līmenī (knišļu tēviņu un mātīšu datus apvieno),

— toksisko mērķparametru aplēses, piemēram, EC_x (un saistītie ticamības intervāli), *NOEC* un/vai *LOEC*, kā arī to noteikšanai izmantotās statistiskās metodes,

— rezultātu apspriešana, arī ietekme uz testēšanas rezultātiem, kuru rada atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

(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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini:

Izstrādāti nosēdumi jeb rekonstituēti, mākslīgi vai sintētiski nosēdumi ir tādu materiālu maisījums, ko izmanto, lai imitētu dabīgu nosēdumu fizikālās sastāvdaļas.

Ūdens virsējais slānis ir ūdens, ar ko nosegti nosēdumi testēšanas traukā.

Starpūdens jeb porūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp nosēdumiem un augsnes daļiņām.

Piesātināti nosēdumi ir nosēdumi, kam pievienota testējamā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

2. papildinājums

Ieteikumi attiecībā uz *Chironomus riparius* kultūru

1. *Chironomus* kāpurus var audzēt kristalizācijas traukos vai lielākās tvertnēs. Smalkas kvarca smiltis izklāj plānā, aptuveni 5–10 mm slānī tvertnes apakšā. Ir pierādīts arī, ka var kā piemērotu substrātu izmantot *Kieselguhr* (piemēram, *Merck*, 8117. pants) (pietiek ar plānāku slāni tikai dažu mm augstumā). Pēc tam pievieno piemērotu ūdeni, lai dziļums būtu vairāki centimetri. Ūdens līmenis ir jāpaaugstina pēc vajadzības, lai aizvietotu iztvaikoto daudzumu un novērstu izžūšanu. Ūdeni var apmainīt, ja vajadzīgs. Jānodrošina lēna aerācija. Kāpuru audzēšanas trauki jātur piemērotā būrī, kas nepieļaus izšķīlušos pieaugušo īpatņu izbēgšanu. Būrim jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama izšķīlušos pieaugušo īpatņu spietošana, pretējā gadījumā nenotiks kopulācija (ne mazāks kā apm. 30 × 30 × 30 cm).

2. Būri jātur istabas temperatūrā vai nemainīgas vides telpā 20 ± 2 °C ar 16 stundu apgaismojuma periodu (intensitāte apm. 1 000 luksi) un 8 stundu tumsas periodu. Ir norādīts, ka gaisa mitrums zem 60 % RH var kavēt reprodukciju.

Ūdens atšķaidīšanai

3. Var izmantot jebkuru piemērotu dabīgu vai sintētisku ūdeni. Bieži izmanto akas ūdeni, krāna ūdeni, no kura attīrīts hlors, un mākslīgas barotnes (piemēram, *Elendt* M4 vai M7 barotni, sk. turpmāk). Ūdenim pirms izmantošanas jānodrošina aerācija. Ja vajadzīgs, kultūras ūdeni var atjaunot, izmantoto ūdeni no kultivēšanas traukiem uzmanīgi nolejot vai sifonējot, nesadragājot kāpuru kūniņas.

Kāpuru barošana

4. *Chironomus* kāpuri ir jābaro ar zivju barības pārslām (*TetraMin*®, *TetraPhyll*® vai citu līdzīga zīmola patentētu zivju barību), katrā traukā dienā ievietojot aptuveni 250 mg. Barību var dot kā sausu samaltu pulveri vai kā suspensiju ūdenī, proti, 1,0 g barības pārslu pievieno 20 ml destilēta ūdens un samaisa, līdz iegūst homogēnu maisījumu. Šo sagatavi var izbarot aptuveni 5 ml apmērā katrā traukā katru dienu (pirms lietošanas sakratīt). Vecāki kāpuri var saņemt vairāk barības.

5. Barošanu pielāgo atbilstīgi ūdens kvalitātei. Ja kultivēšanas barotne kļūst duļķaina, barošana ir jāsamazina. Barības papildinājumi ir rūpīgi jāuzrauga. Pārāk maz barības izraisīs kāpuru emigrāciju vertikālā ūdens slāņa virzienā, savukārt pārāk daudz barības izraisīs mikrobu aktivitātes pieaugumu un samazinās skābekļa koncentrācijas. Abas situācijas var novest pie mazākiem augšanas ātrumiem.

6. Izveidojot jaunus kultivēšanas traukus, var pievienot dažas zaļaļģu (piemēram, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) šūnas.

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu barošana

7. Dažos testos ir iegūtas liecības, ka kokvilnas spilventiņš, kas piesūcināts ar piesātinātu saharozes šķīdumu, var nodrošināt barību izšķīlušiem pieaugušiem īpatņiem.

▼M4

Izšķilšanās

8. Divdesmit grādu ± 2 °C temperatūrā pieaugušie īpatņi sāks šķilties no kāpuru audzēšanas traukiem aptuveni pēc 13–15 dienām. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

Oliņas

9. Tiklīdz vairošanas būrī ir pieaugušie īpatņi, visi kāpuru audzēšanas trauki ir jāpārbauda trīs reizes nedēļā, lai konstatētu izdētās želatīnveidīgās oliņas. Ja tās tiek atklātas, oliņas ir uzmanīgi jāizņem. Tās ir jāievieto nelielā šķīvī, kurā ir vairošanās ūdens paraugs. Oliņas izmanto, lai izveidotu jaunus kultivēšanas traukus (piemēram, 2–4 oliņu kopas katrā traukā), vai tās izmanto toksicitātes testēšanā.

10. Pirmās attīstības stadijas kāpuriem ir jāizšķiļas pēc 2–3 dienām.

Jaunu kultivēšanas trauku izveide

11. Pēc tam, kad ir izveidotas kultūras, katru nedēļu vai retāk var izveidot jaunu kāpuru kultivēšanas trauku atkarībā no testēšanas prasībām un vecos traukus izņem no būriem pēc pieaugušo īpatņu izšķilšanās. Ar šādu sistēmu var nodrošināt regulāru pieaugušo īpatņu piegādi ar minimāliem pārvaldības pasākumiem.

Testēšanas šķīdumu M4 un M7 sagatavošana

12. *Elendt* (1990. gads) ir aprakstījis M4 barotni. M7 barotni sagatavo tāpat kā M4 barotni, izņemot 1. tabulā norādītās vielas, kurām koncentrācijas M7 barotnē ir četras reizes mazākas nekā M4 barotnē. Pašlaik tiek gatavota publikācija par M7 barotni (*Elendt*, individuāls paziņojums). Testēšanas šķīdumu nevajadzētu sagatavot saskaņā ar *Elendt* un *Bias* (1990. gads), jo $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 un K_2HPO_4 koncentrācijas, kas norādītas rezerves šķīdumu sagatavošanai, ir nepiemērotas.

M7 barotnes sagatavošana

13. Katru rezerves šķīdumu (I) sagatavo atsevišķi un apvienoto rezerves šķīdumu (II) pagatavo no šiem rezerves šķīdumiem (I) (sk. 1. tabulu). Piecdesmit mililitrus apvienotā rezerves šķīduma (II) un 2. tabulā norādītos daudzumus no katra makrobarības rezerves šķīduma iemaisa 1 litrā dejonizēta ūdens, lai sagatavotu M7 barotni. Vitamīnu rezerves šķīdumu sagatavo, pievienojot 3 vitamīnus dejonizētam ūdenim, kā norādīts 3. tabulā, un neilgi pirms izmantošanas galīgajai M7 barotnei pievieno 0,1 ml apvienotā vitamīnu rezerves šķīduma. (Vitamīnu rezerves šķīdumu glabā sasaldētu mazos alikvotos.) Barotnei nodrošina aerāciju un to stabilizē.

LITERATŪRA

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**

1. tabula

Barotnes M4 un M7 mikroelementu rezerves šķīdumi

Rezerves šķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto rezerves šķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos rezerves šķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos (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) Šīs vielas atšķiras M4 barotnē un M7 barotnē, kā norādīts iepriekš.
(2) Šos šķīdumus sagatavo atsevišķi un pēc tam salej kopā un nekavējoties liek autoklāvā.

2. tabula

Makrobarības rezerves šķīdumi barotnei M4 un M7

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makrobarības rezerves šķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un 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**

3. tabula

Vitamīnu rezerves šķīdums barotnei M4 un M7. Visus trīs vitamīnu šķīdumus apvieno, lai sagatavotu vienu vitamīnu rezerves šķīdumu

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Vitamīnu rezerves šķīduma tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
Tiamīna hidrohlorīds	750	0,1	0,075
Ciānkobalamīns (B12)	10	0,1	0,0010
Biotīns	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

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. papildinājums

IZSTRĀDĀTU NOSĒDUMU SAGATAVOŠANA

Nosēdumu sastāvs

Izstrādāto nosēdumu sastāvam jābūt šādam:

Sastāvdaļa	Raksturlielumi	% no nosēdumu saussvara
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, kuras pH ir pēc iespējas tuvāk 5,5–6,0 vērtībai, bez redzamām augu atliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs: ≤ 1 mm) un izžāvēta ar gaisu	4–5
Kvarca smiltis	Smilšu graudu izmērs: > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā	75–76
Kaolīna māli	Kaolinīta saturs: ≥ 30 %	20
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdru un smiltis	2 (± 0,5)
Kalcija karbonāts	$CaCO_3$, pulverizēts, ķīmiski tīrs	0,05–0,1
Ūdens	Vadītspēja: ≤ 10 μS/cm	30–50

Sagatavošana

Kūdru izžāvē gaisā un samaļ smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH koriģē ar $CaCO_3$ līdz 5,5 ± 0,5 vērtībai. Suspensiju kondicionē vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobu sastāvdaļu. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt 6,0 ± 0,5. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu homogēnus nosēdumus ar ūdens saturu 30–50 % diapazonā no nosēdumu sausā svara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un to koriģē 6,5–7,5 vērtībā ar $CaCO_3$, ja vajadzīgs. Ņem nosēdumu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Pēc tam, pirms izstrādātos nosēdumus izmanto hironomīdu toksicitātes testēšanā, ir ieteicams tos kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi būs testā.

Glabāšana

Mākslīgo nosēdumu sausās sastāvdaļas var arī uzglabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Izstrādātos (mitros) nosēdumus nedrīkstētu uzglabāt pirms to izmantošanas testā. Tie ir jāizmanto tūlīt pēc septiņu dienu kondicionēšanas perioda, kas pabeidz to sagatavošanu.

LITERATŪRA

Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

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. papildinājums

Atšķaidīšanai piemērota ūdens ķīmiskie raksturlielumi

Viela	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Cietība kā $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Atlikumu hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenīlu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

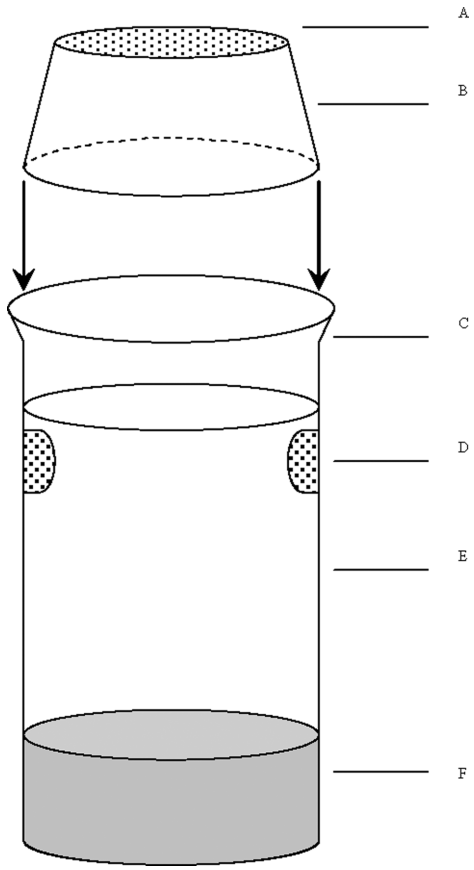
(*) Tomēr jānorāda, ka, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4).

▼**M4**

5. papildinājums

Norādījumi par hironomīdu kāpuru šķilšanās uzraudzību

Uz testēšanas vārglāzēm izvieto izšķilšanās slazdus. Šie slazdi ir nepieciešami, sākot no 20. dienas līdz testēšanas beigām. Turpmāk ir attēlots izmantotā slazda paraugs.



A. Neilona aizsegs

B. Apgāzts plastmasas trauks

C. Bezlūpu ekspozīcijas vārglāze

D. Ūdens apmaiņas aizsega lūkas

E. Ūdens

F. Nosēdumi

▼M4

C.28. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTU ŪDENI

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – *TG*) 219 (2004. gads). Šī testēšanas metode ir izstrādāta ietekmes novērtēšanai, kuru izraisa ķīmisko vielu ilgstoša iedarbība uz nosēdumos dzīvojošiem saldūdens divspārņu kārtas kāpuriem *Chironomus* sp. Tās pamatā galvenokārt ir *BBA* norādījumi par nosēdumu un ūdens testēšanas sistēmas izmantošanu ar mākslīgu augsni un ūdens staba ekspozīcijas scenārijs (1). Tāpat ir ņemti vērā esošie toksicitātes testēšanas protokoli attiecībā uz *Chironomus riparius* un *Chironomus tentans*, kas ir izstrādāti Eiropā un Ziemeļamerikā (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) un kam veikta salīdzinošā izpēte (1) (6) (9). Var izmantot arī citas hironomīdu sugas, piemēram, *Chironomus yoshimatsui*, par ko pieejami detalizēti apraksti (10) (11).

2. Šajā testēšanas metodē izmantotais ekspozīcijas scenārijs paredz ūdens piesātināšanu. Atbilstīgā ekspozīcijas scenārija izvēle ir atkarīga no paredzētā testēšanas lietojuma. Ūdens ekspozīcijas scenārija, kas ietver ūdens staba piesātināšanu, mērķis ir imitēt pesticīdu aerosolu pārvietošanās gadījumus, un šis scenārijs ietver sākuma maksimālās koncentrācijas porūdenī. Šis scenārijs var noderēt arī citiem ekspozīcijas veidiem (tostarp ķīmisko vielu noplūdēm), izņemot akumulācijas procesus, kas ilgst ilgāk nekā testēšanas periods.

3. Vielas, kas jātestē, lai noskaidrotu to iedarbību uz nosēdumos dzīvojošiem organismiem, parasti nosēdumos pastāv ilgstoši. Nosēdumos dzīvojošie organismi var tikt pakļauti iedarbībai dažādos veidos. Katra ekspozīcijas veida relatīvā nozīme un laiks, kas paiet, lai rastos vispārēja toksiska iedarbība, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar log K_{ow} > 5) vai kas izveido homopolāru saiti ar nosēdumiem, būtisks ekspozīcijas veids var būt piesārņotas barības uzņemšana. Lai nodrošinātu, ka izteikti lipofīlu vielu toksicitāte tiek novērtēta pietiekami precīzi, var apsvērt nosēdumiem pievienotās barības izmantošanu pirms testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas. Lai ņemtu vērā visus iespējamos ekspozīcijas veidus, šī testēšanas metode koncentrējas uz ilgtermiņa ekspozīciju. Tests ilgst 20–28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* sugām un 28–65 dienas *C. tentans* sugai. Ja īpašiem nolūkiem ir vajadzīgi īstermiņa dati, piemēram, lai izpētītu nestabilu ķīmisko vielu ietekmi, pēc 10 dienām var pārtraukt papildu atkārtojumus.

4. Mērītie mērķparametri ir izšķīlušos pieaugušo īpatņu kopējais skaits un izšķilšanās laiks. Ir ieteicams kāpuru izdzīvošanas un augšanas mērījumus veikt tikai pēc 10 dienām, ja ir vajadzīgi papildu īstermiņa dati, pēc vajadzības izmantojot papildu atkārtojumus.

5. Ieteicams izmantot izstrādātus nosēdumus. Izstrādātiem nosēdumiem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar dabīgiem nosēdumiem:

— tiek samazināta eksperimentālā mainība, jo šādi nosēdumi izveido atkārtojamu "standartizētu matricu" un nav nepieciešams atrast nepiesārņotus un tīrus nosēdumu avotus,

— testēšanu var sākt jebkurā laikā, nesaskaroties ar sezonālu mainību testēšanas nosēdumos, un nav nepieciešams nosēdumus iepriekš apstrādāt, lai tos attīrītu no vietējās faunas, turklāt izstrādātu nosēdumu izmantošana samazina izmaksas, kas saistītas ar pietiekamu nosēdumu daudzumu savākšanu dabā regulāras testēšanas vajadzībām,

▼M4

— izstrādātu nosēdumu izmantošana ļauj salīdzināt toksicitāti un attiecīgi klasificēt vielas; toksicitātes dati, ko ieguva testēšanā ar dabīgiem un mākslīgiem nosēdumiem, bija salīdzināmi vairākām ķīmiskajām vielām (2).

6. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

7. Vispirms hironomīdu kāpurus jebkurā attīstības stadijā pakļauj testējamās vielas koncentrāciju diapazona iedarbībai nosēdumu un ūdens sistēmās. Testēšanas sākumā pirmās attīstības stadijas kāpurus ievieto testēšanas vārglāzēs, kurās ir nosēdumu un ūdens sistēma, un pēc tam ūdeni piesātina ar testējamo vielu. Hironomīdu izšķilšanos un attīstības ātrumu mēra testēšanas beigās. Kāpuru izdzīvošanu un svaru var noteikt jau pēc 10 dienām, ja vajadzīgs (izmantojot papildu atkārtojumus pēc vajadzības). Šos datus analizē, vai nu izmantojot regresijas modeli, lai aplēstu koncentrāciju, kas izraisītu × % samazinājumu attiecībā uz izšķilšanos, kāpuru izdzīvošanu vai augšanu (piemēram, EC_{15}, EC_{50} utt.), vai izmantojot statistiskās hipotēzes testēšanu, lai noteiktu *NOEC*/*LOEC*. Statistiskās hipotēzes testēšanā ir nepieciešams salīdzināt ietekmes vērtības ar kontroles vērtībām, izmantojot statistiskus testus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

8. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai ūdenī, tās tvaika spiedienam, izmērītajai vai aprēķinātajai daļai nosēdumos un stabilitātei ūdenī un nosēdumos. Jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar ko būtu iespējams kvantificēt testējamo ķīmisko vielu ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos ar zināmu un apstiprinātu precizitāti un noteikšanas ierobežojumu. Lietderīga informācija ietver testējamās ķīmiskās vielas struktūrformulu un tīrību. Tāpat lietderīgi ir zināt testējamās vielas ķīmisko sadalīšanos (piemēram, izkliedēšanās, abiotiskā un biotiskā noārdīšanās utt.). Papildu norādījumi par tādu vielu testēšanu, kuras ir sarežģīti testēt to fizikālo un ķīmisko īpašību dēļ, pieejami atsaucē (12).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

9. Periodiski var testēt ķīmiskās standartvielas, lai pārliecinātos, ka testēšanas protokols un apstākļi ir uzticami. Toksisko standartvielu, kas sekmīgi izmantotas salīdzinošajā testēšanā un validēšanas pētījumos, piemēri ietver lindānu, trifluralīnu, pentahlorfenolu, kadmija hlorīdu un kālija hlorīdu (1) (2) (5) (6) (13).

TESTA DERĪGUMS

10. Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— izšķilšanās apmēram kontroles traukos jābūt vismaz 70 % testēšanas beigās (1) (6),

— *C. riparius* un *C. yoshimatsui* izšķilšanās līdz pieaugušiem īpatņiem no kontroles traukiem jānotiek 12–23 dienu laikā pēc to ievietošanas traukos; *C. tentans* ir vajadzīgas 20–65 dienas,

— testēšanas beigās katrā traukā jānosaka pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija; skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (turpmāk – *ASV*) izmantotajā temperatūrā, savukārt pH ūdens virsējā slānī jābūt 6–9 diapazonā visos testēšanas traukos,

▼M4

— ūdens temperatūra nedrīkstētu atšķirties vairāk kā par ± 1,0 °C; ūdens temperatūru varētu kontrolēt ar izotermisku telpu, un tādā gadījumā temperatūra telpā ir jāapstiprina atbilstīgos laika intervālos.

METODES APRAKSTS

Testēšanas trauki

11. Pētījumu veic 600 ml stikla vārglāzēs ar 8 cm diametru. Der arī citi trauki, bet tiem jānodrošina piemērots ūdens virsējā slāņa un nosēdumu dziļums. Nosēdumu virsmai jābūt pietiekamai, lai nodrošinātu 2–3 cm^2 telpu katram kāpuram. Nosēdumu slāņa dziļuma attiecībai pret ūdens virsējā slāņa dziļumu jābūt 1:4. Testēšanas traukiem un citām iekārtām, kas saskarsies ar testēšanas sistēmu, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla (piemēram, teflona).

Sugu izvēle

12. Testēšanā vēlams izmantot *Chironomus riparius* sugas. Arī *Chironomus tentans* ir piemēroti, bet grūtāk apstrādājami, un tiem vajadzīgs ilgāks testēšanas periods. Var izmantot arī *Chironomus yohimatsui*. Sīka informācija par kultūru metodēm attiecībā uz *Chironomus riparius* ir sniegta 2. papildinājumā. Informācija par kultūras apstākļiem ir pieejama arī attiecībā uz citām sugām, t. i., *Chironomus tentans* (4) un *Chironomus yoshimatsui* (11). Sugu noteikšana ir jāapstiprina pirms testēšanas, bet nav vajadzīga pirms katras testēšanas reizes, ja organismi ir iegūti no laboratorijā kultivētas kultūras.

Nosēdumi

13. Vēlams izmantot izstrādātus nosēdumus (saukti arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem nosēdumiem). Tomēr, ja izmanto dabīgos nosēdumus, tie ir jāraksturo (vismaz pH, organiskā oglekļa sastāvs, ieteicama arī tādu citu parametru noteikšana kā C/N attiecība un granulometrija) un tajos nedrīkstētu būt nekāds piesārņojums un citi organismi, kas varētu konkurēt ar hironomīdiem vai baroties ar tiem. Ieteicams arī pirms izmantošanas hironomīdu toksicitātes testēšanā dabīgos nosēdumus kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi pastāvēs testēšanā. Šajā testā (1) (15) (16) ir ieteicams izmantot šādus izstrādātus nosēdumus, par pamatu izmantojot mākslīgu augsni, ko izmanto C.8. testēšanas metodē (14):

a) 4–5 % (saussvars) kūdras – pēc iespējas pietuvināta pH 5,5–6,0 apmērā; ir svarīgi izmantot pulverizētu kūdru, kas smalki samalta (daļiņu izmērs ≤ 1 mm) un kas ir izžāvēta vienīgi ar gaisu;

b) 20 % (saussvars) kaolīna mālu (kaolinīta saturam vēlams būt virs 30 %);

c) 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (pārsvarā tām jāsastāv no smalkām smiltīm, proti, vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm izmērā);

d) pievieno dejonizētu ūdeni, lai iegūtu galīgā maisījuma mitrumu 30–50 % diapazonā;

e) pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu ($CaCO_3$), lai koriģētu galīgā nosēdumu maisījuma pH 7,0 ± 0,5 apmērā;

f) galīgā maisījuma organiskā oglekļa saturam jābūt 2 % (± 0,5), un tas jākoriģē, izmantojot atbilstīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu.

▼M4

14. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu un smilšu avotam. Nosēdumu sastāvdaļas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tajās nav ķīmiska piesārņojuma (piemēram, smago metālu, hlororganisko savienojumu, fosfororganisko savienojumu utt.). Izstrādātu nosēdumu sagatavošanas piemērs ir aprakstīts 3. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja tiek pierādīts, ka pēc ūdens virsējā slāņa pievienošanas nenotiek nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās (piemēram, kūdras daļiņu peldēšana pa ūdens virsmu) un ka kūdra vai nosēdumi ir pietiekami kondicionēti.

Ūdens

15. Jebkurš ūdens, kas atbilst 2. un 4. papildinājumā noteiktajiem pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots kā testēšanas ūdens. Jebkāds piemērots ūdens, proti, dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens (sk. 2. papildinājumu) vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams kā kultūras turēšanas un testēšanas ūdens, ja hironomīdi tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas un testēšanas laikā. Testēšanas sākumā testēšanas ūdens pH jābūt 6–9 diapazonā, savukārt kopējā cietība nedrīkst pārsniegt 400 mg/l kā $CaCO_3$. Tomēr, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4). Visa pētījuma laikā jāizmanto viena veida ūdens. Ūdens kvalitātes raksturlielumi, kas uzskaitīti 4. papildinājumā, jānosaka vismaz divreiz gadā vai tad, kad ir aizdomas, ka šie raksturlielumi varētu būt būtiski izmainījušies.

Rezerves šķīdumi – piesātināts ūdens

16. Testēšanas koncentrācijas aprēķina, pamatojoties uz koncentrācijām ūdens stabā, t. i., ūdens virsējā slānī virs nosēdumiem. Izraudzīto koncentrāciju testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot rezerves šķīdumu. Rezerves šķīdumus vēlams pagatavot, izšķīdinot testējamo vielu testēšanas barotnē. Lai iegūtu piemērotas koncentrācijas rezerves šķīdumu, dažos gadījumos var nākties izmantot šķīdinātājus vai dispersantus. Piemērotu šķīdinātāju piemēri ir acetons, etilspirts, metilspirts, etilēnglikola monoetilēteris, etilēnglikola dimetilēteris, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Dispersanti, ko var izmantot, ir *Cremophor* RH40, *Tween* 80, metilceluloze 0,01 % un HCO-40. Šķīdinātājas vielas koncentrācijai galīgajā testēšanas barotnē jābūt minimālai (t. i., $\leq$ 0,1 ml/l) un vienādai visās apstrādēs. Ja tiek izmantota šķīdinātāja viela, tai nedrīkst būt ievērojama ietekme uz izdzīvošanu vai redzama negatīva ietekme uz hironomīdu kāpuriem, ko var atklāt, pateicoties kontroles traukiem, kuri saņem tikai šķīdumu. Jebkurā gadījumā ir jācenšas izvairīties no šādu materiālu izmantošanas.

TESTĒŠANAS PLĀNS

17. Testēšanas plāns attiecas uz testēšanas koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, trauku skaitu katram koncentrācijas līmenim un kāpuru skaitu traukā. Ir aprakstīti plāni ietekmes koncentrāciju (turpmāk – *EC*) punktu noteikšanai, *NOEC* noteikšanai un pieļaujamā daudzuma testa veikšanai. Regresijas analīze ir ieteicamāka nekā hipotēzes testēšanas pieeja.

Regresijas analīzes plāns

18. Testēšanā izmantotajām koncentrācijām ir jāaptver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{15}, EC_{50}) un koncentrāciju diapazons, kurā ir jānoskaidro testējamās vielas ietekme. Tas, ka ietekmes koncentrācija ir testēšanā izmantoto koncentrāciju diapazonā, parasti uzlabo ietekmes koncentrāciju (EC_x) noteikšanas precizitāti un it sevišķi derīgumu. Jāizvairās no ekstrapolācijas

▼M4

krietni zem zemākās pozitīvās koncentrācijas vai virs augstākās koncentrācijas. Ir lietderīgi veikt orientējošu diapazona noteikšanas testēšanu, lai izvēlētos izmantojamo koncentrāciju diapazonu (sk. 27. punktu).

19. Ja ir jānosaka EC_x, jātestē vismaz piecas koncentrācijas un trīs atkārtojumi katrai koncentrācijai. Jebkurā gadījumā ieteicams izmantot pietiekamu daudzumu testēšanas koncentrāciju, lai nodrošinātu modeli pamatotām aplēsēm. Koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2 (izņēmums varētu būt gadījumi, kad devu un atbildes reakcijas līknei ir sekls slīpums). Katras apstrādes atkārtojumu skaitu var samazināt, ja palielina testēšanas koncentrāciju skaitu ar dažādām atbildes reakcijām. Atkārtojumu skaita palielināšana vai testēšanas koncentrāciju intervālu samazināšana parasti noved pie šaurākiem testēšanas ticamības intervāliem. Ir vajadzīgi papildu atkārtojumi, ja kāpuru izdzīvošanu un augšanu nosaka jau pēc 10 dienām.

NOEC/LOEC noteikšanas plāns

20. Ja ir jānosaka *LOEC/NOEC*, jāizmanto piecas testēšanas koncentrācijas ar vismaz četriem atkārtojumiem un koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2. Atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu statistisko nozīmību un varētu konstatēt 20 % atšķirību no kontroles traukiem pie 5 % nozīmības līmeņa (p = 0,05). Attiecībā uz attīstības ātrumu parasti ir piemēroti veikt dispersijas analīzi (turpmāk – *ANOVA*), piemēram, *Dunnett* testu vai *Williams* testu (17) (18) (19) (20). Attiecībā uz izšķilšanās koeficientu var izmantot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieeju (ar *Bonferroni* korekciju) vai *Mantel- Haenszel* testu.

Pieļaujamā daudzuma testēšana

21. Pieļaujamā daudzuma testēšanu (viena testēšanas koncentrācija un kontroles trauks) var veikt, ja orientējošā diapazona noteikšanas testā netika konstatēta ietekme. Pieļaujamā daudzuma testēšanas mērķis ir norādīt, ka testējamās vielas toksiskā vērtība ir lielāka par testēto robežkoncentrāciju. Šajā testēšanas metodē nav iespējams ierosināt ieteikto koncentrāciju, lēmums par to ir jāpieņem regulatoriem. Parasti ir vajadzīgi vismaz seši atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Ir jāpanāk pietiekama statistiskā nozīmība, lai varētu noteikt 20 % atšķirību no kontroles trauka pie 5 % nozīmības līmeņa (p = 0,05). Ar metrisku atbildes reakciju (attīstības ātrums un svars) t-testēšana parasti ir piemērota statistiskā metode, ja dati atbilst šā testa prasībām (normalitāte, homogēnas dispersijas). Var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testēšanu vai ar parametriem nesaistītu testu, piemēram, *Wilcoxon-Mann-Whithey* testu, ja nav atbilstības iepriekš norādītajām prasībām. Attiecībā uz izšķilšanās koeficientu ir piemērota *Fisher* pieeja.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Piesātinātās ūdens un nosēdumu sistēmas sagatavošana

22. Atbilstīgus daudzumus izstrādātu nosēdumu (sk. 3. papildinājuma 13. un 14. punktu) pievieno testēšanas traukā, lai izveidotu vismaz 1,5 cm dziļu slāni. Ūdeni pielej 6 cm biezā slānī (sk. 15. punktu). Nosēdumu slāņa dziļuma attiecība pret ūdens slāņa dziļumu nedrīkstētu pārsniegt 1:4, un nosēdumu slānis nedrīkstētu būt dziļāks par 3 cm. Nosēdumu un ūdens sistēmai jānodrošina lēna aerācija septiņas dienas, pirms tiek ielaisti testēšanas organismi (sk. 14. punktu un 3. papildinājumu). Lai izvairītos no nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās un mazu daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens stabā testēšanas ūdens pievienošanas laikā, nosēdumus var pārklāt ar plastmasas ripu ūdens uzliešanas laikā, bet pēc tam ripu nekavējoties noņem. Šim nolūkam der arī citas ierīces.

▼M4

23. Testēšanas trauki ir jāapsedz (piemēram, ar stikla plāksnēm). Ja vajadzīgs, pētījuma laikā ūdens līmeņus papildina līdz sākotnējam tilpumam, lai kompensētu ūdens iztvaikošanu. Tam jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, lai novērstu sāļu uzkrāšanos.

Testēšanas organismu pievienošana

24. Četras līdz piecas dienas pirms testēšanas organismu pievienošanas testēšanas traukos no kultūrām jāizņem oliņas un tās jāievieto nelielos traukos ar audzēšanas barotni. Var izmantot noturētu barotni no rezerves kultūras vai svaigi sagatavotu barotni. Ja izmanto svaigi sagatavotu barotni, kultūras barotnei jāpievieno neliels daudzums barības, piemēram, zaļaļģes un/vai daži pilieni filtrāta no smalki samaltas zivju barības pārslu suspensijas (sk. 2. papildinājumu). Jāizmanto tikai svaigi izdētas oliņas. Parasti kāpuri sāk šķilties dažas dienas pēc oliņu izdēšanas (2–3 dienas *Chironomus riparius* 20 °C un 3–4 dienas *Chironomus tentans* 23 °C un *Chironomus yoshimatui* 25 °C), un kāpuru augšana notiek četrās attīstības stadijās, no kurām katra ilgst 4–8 dienas. Testēšanā jāizmanto pirmās attīstības stadijas kāpuri (2–3 vai 1–4 dienas pēc izšķilšanās). Knišļu attīstības stadiju var pārbaudīt, izmantojot galvas kapsulas platumu (6).

25. Katrā testēšanas traukā ar piesātinātiem nosēdumiem un ūdeni pēc nejaušības principa ievieto 20 pirmās attīstības stadijas kāpurus, izmantojot neasu pipeti. Kāpuru ievietošanas laikā testēšanas traukos ir jāpārtrauc ūdens aerācija, un šis pārtraukums jāturpina vēl 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas (sk. 24. un 32. punktu). Saskaņā ar izmantoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu) izmantoto kāpuru skaits uz katru koncentrāciju ir vismaz 60, lai noteiktu *EC* punktus, un 80, lai noteiktu *NOEC*.

26. Kad ir pagājušas 24 stundas kopš kāpuru ielaišanas, ūdens virsējo slāni piesātina ar testējamo vielu un atsāk lēnu aerāciju. Nelielus testējamās vielas šķīdumu tilpumus pievieno zem ūdens virsmas, izmantojot pipeti. Pēc tam ūdens virsējais slānis ir uzmanīgi jāsamaisa, neizkustinot nosēdumus.

Testēšanas koncentrācijas

27. Diapazona noteikšanas tests varētu būt lietderīgs, lai noteiktu koncentrāciju diapazonu galīgajam testam. Šim nolūkam izmanto virkni atšķirīgu testējamās vielas koncentrāciju. Lai hironomīdiem nodrošinātu tādu pašu virsmas blīvumu, kādu izmantos galīgajā testēšanā, hironomīdus pakļauj katras testējamās vielas koncentrācijas iedarbībai uz tādu laiku, kas ļauj aplēst aptuvenās testēšanas koncentrācijas. Atkārtojumi nav vajadzīgi.

28. Lēmumu par testēšanas koncentrācijām galīgajam testam pieņem, pamatojoties uz diapazona noteikšanas testa rezultātiem. Jāizmanto un saskaņā ar 18.–20. punktu jāizvēlas vismaz piecas koncentrācijas.

Kontroles trauki

29. Testēšanā ir jāietver kontroles trauki, kuros nav testējamās vielas, bet ir nosēdumi un kuriem nodrošina atbilstīgu skaitu atkārtojumu (sk. 19. un 20. punktu). Ja testējamās vielas pievienošanai ir izmantots šķīdums (sk. 16. punktu), jāizmanto arī nosēdumu šķīduma kontroles trauks.

▼M4

Testēšanas sistēma

30. Izmanto statiskas sistēmas. Izņēmuma gadījumos, piemēram, ja ūdens kvalitātes specifikācijas nav piemērotas testēšanas organismam vai ietekmē ķīmisko līdzsvaru (piemēram, izšķīdušā skābekļa līmeņi pārmērīgi pazeminās, izvadproduktu koncentrācija pārmēru paaugstinās vai no nosēdumiem ekstrahējas minerāli un ietekmē pH un/vai ūdens cietību), var izmantot daļēji statiskas vai caurplūdes sistēmas ar ūdens virsējā slāņa periodisku vai nepārtrauktu atjaunošanu. Tomēr parasti derēs un ir ieteicamas citas ūdens virsējā slāņa kvalitātes uzlabošanas metodes, piemēram, aerācija.

Barība

31. Kāpuri ir jābaro, vēlams, katru dienu vai vismaz trīs reizes nedēļā. Katram jaunam kāpuram pirmās 10 dienas pietiek ar zivju barību (suspensija ūdenī vai smalki samalta barība, piemēram, *TetraMin* vai *TetraPhyll*, sk. 2. papildinājumu) 0,25–0,5 mg apmērā (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui*). Nedaudz vairāk barības varētu vajadzēt vecākiem kāpuriem, proti, 0,5–1 mg uz kāpuru dienā, ar ko vajadzētu pietikt līdz testēšanas beigām. Ja tiek novērota sēnīšu augšana vai ja kontroles traukos ir novērota mirstība, barības porcija ir jāsamazina visos traukos un jākontrolē. Ja sēnīšu attīstību neizdodas apturēt, testēšana ir jāatkārto. Ja tiek testētas vielas, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar log K_{ow} > 5) vai kas izveido homopolāru saiti ar nosēdumiem, barības daudzumu, kurš vajadzīgs organismu izdzīvošanas un dabīgas augšanas nodrošināšanai, var pievienot izstrādātajiem nosēdumiem pirms stabilizācijas perioda. Šādam nolūkam jāizmanto augu materiāls, nevis zivju barība, proti, var pievienot 0,5 % (saussvars) smalki samaltas lapas, piemēram, nātres (*Urtica dioica*), zīdkoka (*Morus alba*), baltā āboliņa (*Trifolium repens*) vai spinātu (*Spinacia oleracea*) lapas, vai citu augu materiālu (*Cerophyl* vai alfa-celulozi).

Inkubācijas apstākļi

32. Kad ir pagājušas, vēlams, 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas, testēšanas traukos ūdens virsējam slānim nodrošina lēnu aerāciju, ko turpina visa testēšanas laikā (jāuzmanās, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nepazeminās zem 60 % no *ASV*). Aerāciju nodrošina caur stikla Pastēra pipeti, kas piestiprināta 2–3 cm virs nosēdumu slāņa (t. i., vienu vai dažus burbuļus sekundē). Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, var apsvērt iespēju nosēdumu un ūdens sistēmai aerāciju nenodrošināt.

33. Testēšanu veic nemainīgā 20 °C (± 2 °C) temperatūrā. *C. tentans* un *C. yoshimatui* ieteicamā temperatūra ir attiecīgi 23 °C un 25 °C (± 2 °C). Piemēro 16 stundu apgaismojuma ilgumu, un gaismas intensitātei jābūt 500–1 000 luksiem.

Ekspozīcijas ilgums

34. Ekspozīcija sākas brīdī, kad kāpuri tiek ielaisti piesātinātajos un kontroles traukos. Maksimālais ekspozīcijas ilgums ir 28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* un 65 dienas *C. tentans*. Ja knišļi izšķiļas ātrāk, testēšanu var pārtraukt ne mazāk kā pēc piecām dienām pēc pēdējā pieaugušā īpatņa izšķilšanās kontroles traukā.

NOVĒROJUMI

Izšķilšanās

35. Nosaka pilnībā izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu attīstības laiku un kopējo skaitu. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

▼M4

36. Testēšanas trauki ir jānovēro vismaz trīs reizes nedēļā, lai vizuāli novērtētu jebkādas anomālijas (piemēram, nosēdumu pamešana, neparasta peldēšana) salīdzinājumā ar kontroles traukiem. Paredzamās izšķilšanās periodā katru dienu jāskaita izšķīlušies knišļi. Katru dienu reģistrē pilnībā izšķīlušos knišļu dzimumu un skaitu. Pēc identificēšanas knišļus izņem no traukiem. Oliņas, kas izdētas pirms testa pabeigšanas, ir jāreģistrē un jāizņem, lai novērstu kāpuru atjaunošanos nosēdumos. Jāreģistrē arī redzamo kūniņu skaits, kuras nav izšķīlušās. Norādījumi par izšķilšanās mērīšanu ir sniegti 5. papildinājumā.

Augšana un izdzīvošana

37. Ja ir jāsniedz dati par kāpuru izdzīvošanu un augšanu pēc 10 dienām, sākumā jāietver papildu testēšanas trauki, lai tos varētu izmantot šim nolūkam. Šo papildu trauku nosēdumus izkāš, izmantojot 250 μm sietu, lai saglabātu kāpurus. Nāves kritēriji ir nekustīgums vai atbildes reakcijas trūkums uz mehānisku kairinājumu. Neatgūtie kāpuri arī jāuzskata par mirušiem (kāpurus, kas nomiruši testēšanas sākumā, iespējams, ir noārdījuši mikrobi). Nosaka izdzīvojušo kāpuru sauso svaru (bez pelniem) katrā testēšanas traukā un aprēķina vidējo atsevišķo saussvaru katrā traukā. Ir lietderīgi noteikt, kurai attīstības stadijai pieder izdzīvojušais kāpurs. Šim nolūkam var izmantot katra īpatņa galvas kapsulas platuma mērījumu.

Analītiskie mērījumi

Testējamās vielas koncentrācija

38. Testēšanas sākumā (vēlamāk tad, kad ir pagājusi viena stunda pēc testējamās vielas pievienošanas) un beigās analizē vismaz ūdens virsējā slāņa, porūdens un nosēdumu paraugus no augstākās un zemākās koncentrācijas. Šāda testējamās vielas koncentrācijas noteikšana sniedz informāciju par testējamās vielas attīstību/sadalīšanos ūdens un nosēdumu sistēmā. Nosēdumu paraugu ņemšana testēšanas sākumā var ietekmēt testēšanas sistēmu (piemēram, var tikt izņemti testēšanas kāpuri), tādējādi analītisku mērījumu vajadzībām testēšanas sākumā un laikā jāizmanto papildu testēšanas trauki, ja tas ir atbilstīgi (sk. 39. punktu). Mērījumi nosēdumos var nebūt nepieciešami, ja testējamās vielas sadalīšanās starp ūdeni un nosēdumiem ir skaidri noteikta ūdens/nosēdumu pētījumā salīdzināmos apstākļos (piemēram, nosēdumu un ūdens attiecība, pievienošanas veids, organiskā oglekļa saturs nosēdumos).

39. Ja veic starpposma mērījumus (piemēram, septītajā dienā) un ja analīzei ir vajadzīgi lieli paraugi, ko nevar paņemt no testēšanas traukiem, neietekmējot testēšanas sistēmu, jāveic analītiska noteikšana no paraugiem, kuri ņemti no papildu testēšanas traukiem, kas saņēmuši tādu pašu apstrādi (ietverot testēšanas organismus), bet netiek izmantoti bioloģiskajiem novērojumiem.

40. Lai izolētu starpūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g 4 °C temperatūrā 30 minūtes. Tomēr, ja tiek pierādīts, ka testējamā viela neadsorbējas uz filtriem, var būt pieņemami izmantot arī filtrēšanu. Dažos gadījumos var būt neiespējami analizēt koncentrācijas porūdenī, jo parauga izmērs ir pārāk mazs.

▼M4

Fizikālie un ķīmiskie parametri

41. Atbilstīgi ir jānosaka testēšanas ūdens pH un izšķīdušais skābeklis un testēšanas trauku temperatūra (sk. 10. punktu). Testēšanas sākumā un beigās jānosaka arī cietība un amonjaks kontroles traukos un vienā testēšanas traukā ar augstāko koncentrāciju.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Šā testa mērķis ir noteikt testējamās vielas ietekmi uz attīstības ātrumu un pilnībā izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu kopējo skaitu vai – 10 dienu testēšanas gadījumā – ietekmi uz kāpuru izdzīvošanu un svaru. Ja nav nekādu norāžu par statistiski atšķirīgu jutību atkarībā no dzimuma, tēviņu un mātīšu rezultātus var apvienot, lai veiktu statistisko analīzi. Jutības atšķirības starp dzimumiem var statistiski novērtēt, piemēram, ar $\chi^2 - r \times 2$ testu. Ja vajadzīgs, pēc 10 dienām ir jānosaka kāpuru izdzīvošana un vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā.

43. Ietekmes koncentrācijas, kas izteiktas kā koncentrācijas ūdens virsējā slānī, vēlams aprēķināt, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām testēšanas sākumā (sk. 38. punktu).

44. Lai aprēķinātu punktu aplēsi EC_{50} vai jebkurai citai EC_x, kā patiesus atkārtojumus var izmantot statistiku par situāciju pirms ievietošanas traukos. Aprēķinot ticamības intervālu jebkurai EC_x, jāņem vērā mainība starp traukiem vai ir jāpierāda, ka šī mainība ir tik maza, ka to var neņemt vērā. Ja modeli aprīko saskaņā ar mazāko kvadrātu metodi, statistika par situāciju pirms ievietošanas traukos ir jākoriģē, lai uzlabotu mainības homogenitāti. Tomēr EC_x vērtības ir jāaprēķina pēc tam, kad atbildes reakcija ir atkoriģēta atpakaļ uz sākotnējo vērtību.

45. Ja statistiskās analīzes mērķis ir noteikt *NOEC*/*LOEC* ar hipotēzes testēšanu, jāņem vērā mainība starp traukiem, piemēram, ar ieligzdotu *ANOVA*. Var arī izmantot stabilākus testus (21) situācijās, kad ir pārkāpti parastie *ANOVA* pieņēmumi.

Izšķilšanās koeficients

46. Izšķilšanās koeficienti ir kvantitatīvi dati, ko var analizēt ar *Cochran-Armitage* testu, kuru īsteno pakāpeniski, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja šie dati atbilst šādai prognozei. Ja minētais tests analīzei neder, var izmantot *Fisher* pieeju vai *Mantel- Haenszel* testu ar *Bonferroni-Holm* koriģētajām p-vērtībām. Ja pastāv liecības par lielāku mainību starp atkārtojumiem ar vienu un to pašu koncentrāciju, nekā to norādītu binomināls sadalījums (nereti uz to atsaucas kā uz "papildu binominālu" mainību), tad jāizmanto stabils *Cochran-Armitage* vai *Fisher* pieejas tests, kā ierosināts atsaucē (21).

47. Nosaka katrā traukā izšķīlušos knišļu summu (n_e), ko dala ar ielaisto kāpuru skaitu (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

kur:

ER = izšķilšanās koeficients;

n_e = katrā traukā izšķīlušos knišļu skaits;

n_a = katrā traukā ielaisto kāpuru skaits.

48. Lieliem paraugu apjomiem piemērota alternatīva, ja pastāv papildu binomināla mainība, ir iespēja izšķilšanās koeficientu uzskatīt par nepārtrauktu atbildes reakciju un izmantot tādas procedūras kā *William* tests, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja tas atbilst šiem izšķilšanās koeficienta datiem. *Dunnett* tests būtu piemērots, ja monotonuma nav. Šajā kontekstā liels parauga apjoms tiek definēts kā gadījums, kad gan izšķīlušos īpatņu skaits, gan neizšķīlušos īpatņu skaits pārsniedz piecus katrā atkārtojumā (traukā).

49. Lai piemērotu *ANOVA* metodes, izšķilšanās koeficienta vērtības ir vispirms jāpārvērš ar *arcsin* kvadrātsaknes transformāciju vai ar *Tukey-Freeman* transformāciju, lai iegūtu aptuveno normālo sadalījumu un izlīdzinātu mainības. Izmantojot absolūto periodiskumu, var piemērot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieejas (*Bonferroni*) vai *Mantel- Haenszel* testu. *Arcsin* kvadrātsaknes transformāciju piemēro, ņemot izšķilšanās koeficienta kvadrātsaknes inverso sinusu ($\sin^{-1}$).

50. Izšķilšanās koeficientiem EC_x vērtības aprēķina, izmantojot regresijas analīzi (vai, piemēram, *probit* (22), *logit*, *Weibull*, atbilstīgu tirdzniecībā pieejamu programmatūru utt.). Ja regresijas analīze ir nesekmīga (piemēram, tiek iegūtas mazāk nekā divas daļējas atbildes reakcijas), izmanto citas ar parametriem nesaistītas metodes, tādas kā slīdošā vidējā vai vienkāršā interpolācija.

Attīstības ātrums

51. Vidējais attīstības laiks ir vidējais laikposms starp kāpuru ielaišanu (testa 0. diena) un testēšanas knišļu izšķilšanos. (Lai aprēķinātu patieso attīstības laiku, jāapsver kāpuru vecums ielaišanas brīdī.) Attīstības ātrums ir attīstības laika apgrieztā vērtība (vienība: 1/diena) un ir kāpuru vienas dienas attīstības daļa. Attīstības ātrums ir ieteicamāks, lai novērtētu šos nosēdumu toksicitātes pētījumus, jo tā mainība ir mazāka un tas ir homogēnāks un tuvāks normālam sadalījumam salīdzinājumā ar attīstības laiku. Tādējādi efektīvas parametru testēšanas procedūras var izmantot drīzāk ar attīstības ātrumu, nevis ar attīstības laiku. Attiecībā uz attīstības ātrumu kā nepārtrauktu atbildes reakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot regresijas analīzi (piemēram, (23) (24)).

52. Turpmākajiem statistiskajiem testiem pieņem, ka pārbaudes dienā x novēroto knišļu skaits ir izšķīlies vidējā laika intervālā starp dienu x un dienu x – l (l = pārbaudes intervāla ilgums, parasti 1 diena). Katra trauka vidējo attīstības ātrumu ($\bar{x}$) aprēķina šādi:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kur:

$\bar{x}$: vidējais attīstības ātrums katrā traukā;

i: pārbaudes intervāla indekss;

m: pārbaudes intervālu maksimālais skaits;

▼M4

f_i: pārbaudes intervālā i izšķīlušos knišļu skaits;

n_e: kopējais knišļu skaits, kas izšķīlušies eksperimenta beigās (= $\sum f_i$)

x_i: intervālā i izšķīlušos knišļu attīstības ātrums.

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kur:

day_i: pārbaudes diena (dienas kopš ielaišanas);

l_i: pārbaudes intervāla i ilgums (dienas, parasti viena diena).

Testēšanas pārskats

53. Testēšanas pārskatā jāietver vismaz šāda informācija:

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālās un ķīmiskās īpašības (šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, sadalīšanās koeficients augsnē (vai nosēdumos, ja pieejams), stabilitāte ūdenī utt.),

— ķīmiskās identifikācijas dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, *CAS* numurs utt.), ietverot tīrību un analītisko metodi, ar ko ir iespējams kvantificēt testējamo vielu.

Testēšanas sugas:

— izmantotie testēšanas dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu avots un pavairošanas apstākļi,

— informācija par oliņu un kāpuru apstrādi,

— testēšanas dzīvnieku vecums ielaišanas brīdī testēšanas traukos.

Testēšanas apstākļi:

— izmantotie nosēdumi, t. i., dabīgi vai izstrādāti nosēdumi,

— dabīgajiem nosēdumiem – nosēdumu paraugu ņemšanas vietas atrašanās vieta un apraksts, ietverot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi; raksturlielumi – pH, organiskā oglekļa saturs, C/N attiecība un granulometrija (ja vajadzīgs),

— izstrādāto nosēdumu sagatavošana: sastāvdaļas un raksturlielumi (organiskā oglekļa saturs, pH, mitrums utt. testēšanas sākumā),

— testēšanas ūdens sagatavošana (ja izmanto rekonstituētu ūdeni) un raksturlielumi (skābekļa koncentrācija, pH, vadītspēja, cietība utt. testēšanas sākumā),

— nosēdumu un ūdens virsējā slāņa dziļums,

— ūdens virsējā slāņa un porūdens tilpums; mitru nosēdumu svars ar porūdeni un bez tā,

— testēšanas trauki (materiāls un izmērs),

— rezerves šķīdumu un testēšanas koncentrāciju sagatavošanas metode,

▼M4

— testējamās vielas pievienošana: izmantotās testēšanas koncentrācijas, atkārtojumu skaits un šķīdums, ja tas izmantots,

— inkubācijas apstākļi: temperatūra, apgaismojuma cikls un intensitāte, aerācija (regularitāte un intensitāte),

— sīka informācija par barošanu, arī par barības veidu, sagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu.

Rezultāti:

— testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērītās testēšanas koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju testēšanas traukā,

— ūdens kvalitāte testēšanas traukos, t. i., pH, temperatūra, izšķīdušais skābeklis, cietība un amonjaks,

— iztvaikojušā testēšanas ūdens aizvietošana, ja tā veikta,

— izšķīlušos knišļu tēviņu un mātīšu skaits katrā traukā un katru dienu,

— to kāpuru skaits katrā traukā, kas neizšķīlās par knišļiem,

— kāpuru vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā un katrā attīstības stadijā, ja vajadzīgs,

— izšķilšanās īpatsvars katrā atkārtojumā un testēšanas koncentrācijā (knišļu tēviņu un mātīšu datus apvieno),

— pilnībā izšķīlušos knišļu vidējais attīstības ātrums katrā atkārtojumā un apstrādes līmenī (knišļu tēviņu un mātīšu datus apvieno),

— toksisko mērķparametru aplēses, piemēram, EC_x (un saistītie ticamības intervāli), *NOEC* un/vai *LOEC*, kā arī to noteikšanai izmantotās statistiskās metodes,

— rezultātu apspriešana, arī ietekme uz testēšanas rezultātiem, kuru rada atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

(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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā metodē ir izmantoti šādi termini:

Izstrādāti nosēdumi jeb rekonstituēti, mākslīgi vai sintētiski nosēdumi ir tādu materiālu maisījums, ko izmanto, lai imitētu dabīgu nosēdumu fizikālās sastāvdaļas.

Ūdens virsējais slānis ir ūdens, ar ko nosegti nosēdumi testēšanas traukā.

Starpūdens jeb porūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp nosēdumiem un augsnes daļiņām.

Piesātināts ūdens ir testēšanas ūdens, kam pievienota testējamā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

2. papildinājums

Ieteikumi attiecībā uz *Chironomus riparius* kultūru

1. *Chironomus* kāpurus var audzēt kristalizācijas traukos vai lielākās tvertnēs. Smalkas kvarca smiltis izklāj plānā, aptuveni 5–10 mm slānī tvertnes apakšā. Ir pierādīts arī, ka kā piemērotu substrātu var izmantot *Kieselguhr* (piemēram, *Merck*, 8117. pants) (pietiek ar plānāku slāni tikai dažu mm augstumā). Pēc tam pievieno piemērotu ūdeni, lai dziļums būtu vairāki cm. Ūdens līmenis ir jāpaaugstina pēc vajadzības, lai aizvietotu iztvaikoto daudzumu un novērstu izžūšanu. Ūdeni var apmainīt, ja vajadzīgs. Jānodrošina lēna aerācija. Kāpuru audzēšanas trauki jātur piemērotā būrī, kas nepieļaus izšķīlušo pieaugušo īpatņu izbēgšanu. Būrim jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama izšķīlušo pieaugušo īpatņu spietošana, pretējā gadījumā nenotiks kopulācija (ne mazāks kā apm. 30 × 30 × 30 cm).

2. Būri jātur istabas temperatūrā vai nemainīgas vides telpā 20 ± 2 °C ar 16 stundu apgaismojuma periodu (intensitāte apm. 1 000 luksi) un astoņu stundu tumsas periodu. Ir norādīts, ka gaisa mitrums zem 60 % RH var kavēt reprodukciju.

Ūdens atšķaidīšanai

3. Var izmantot jebkuru piemērotu dabīgu vai sintētisku ūdeni. Bieži izmanto akas ūdeni, krāna ūdeni, no kura attīrīts hlors, un mākslīgu līdzekli (piemēram, *Elendt* M4 vai M7 barotni, sk. turpmāk). Ūdenim pirms izmantošanas jānodrošina aerācija. Ja vajadzīgs, kultūras ūdeni var atjaunot, izmantoto ūdeni no kultivēšanas traukiem uzmanīgi nolejot vai sifonējot, nesadragājot kāpuru kūniņas.

Kāpuru barošana

4. *Chironomus* kāpuri ir jābaro ar zivju barības pārslām (*TetraMin*®, *TetraPhyll*® vai citu līdzīga zīmola patentētu zivju barību), katrā traukā dienā ievietojot aptuveni 250 mg. Barību var dot kā sausu samaltu pulveri vai kā suspensiju ūdenī, proti, 1,0 g barības pārslu pievieno 20 ml destilēta ūdens un samaisa, līdz iegūst homogēnu maisījumu. Šo sagatavi var izbarot aptuveni 5 ml apmērā katrā traukā katru dienu (pirms lietošanas sakratīt). Vecāki kāpuri var saņemt vairāk barības.

5. Barošanu pielāgo atbilstīgi ūdens kvalitātei. Ja kultivēšanas barotne kļūst duļķaina, barošana ir jāsamazina. Barības papildinājumi ir rūpīgi jāuzrauga. Pārāk maz barības izraisīs kāpuru emigrāciju vertikālā ūdens slāņa virzienā, savukārt pārāk daudz barības izraisīs mikrobu aktivitātes pieaugumu un samazinās skābekļa koncentrācijas. Abas situācijas var novest pie mazākiem augšanas ātrumiem.

6. Izveidojot jaunus kultivēšanas traukus, var pievienot dažas zaļaļģu (piemēram, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) šūnas.

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu barošana

7. Dažos testos ir iegūtas liecības, ka kokvilnas spilventiņš, kas piesūcināts ar piesātinātu saharozes šķīdumu, var nodrošināt barību izšķīlušiem pieaugušiem īpatņiem.

▼M4

Izšķilšanās

8. Divdesmit grādu ± 2 °C temperatūrā pieaugušie īpatņi sāks šķilties no kāpuru audzēšanas traukiem aptuveni pēc 13–15 dienām. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

Oliņas

9. Tiklīdz vairošanas būrī ir pieaugušie īpatņi, visi kāpuru audzēšanas trauki ir jāpārbauda trīs reizes nedēļā, lai konstatētu izdētās želatīnveidīgās oliņas. Ja tās tiek atklātas, oliņas ir uzmanīgi jāizņem. Tās ir jāievieto nelielā šķīvī, kurā ir vairošanās ūdens paraugs. Oliņas izmanto, lai izveidotu jaunus kultivēšanas traukus (piemēram, 2–4 oliņu kopas katrā traukā), vai tās izmanto toksicitātes testēšanā.

10. Pirmās attīstības stadijas kāpuriem ir jāizšķiļas pēc 2–3 dienām.

Jaunu kultivēšanas trauku izveide

11. Pēc tam, kad ir izveidotas kultūras, katru nedēļu vai retāk var izveidot jaunu kāpuru kultivēšanas trauku atkarībā no testēšanas prasībām un vecos traukus izņem no būriem pēc pieaugušo īpatņu izšķilšanās. Ar šādu sistēmu var nodrošināt regulāru pieaugušo īpatņu piegādi ar minimāliem pārvaldības pasākumiem.

Testēšanas šķīdumu M4 un M7 sagatavošana

12. *Elendt* (1990. gads) ir aprakstījis M4 barotni. M7 barotni sagatavo tāpat kā M4 barotni, izņemot 1. tabulā norādītās vielas, kurām koncentrācijas M7 barotnē ir četras reizes mazākas nekā M4 barotnē. Pašlaik tiek gatavota publikācija par M7 barotni (*Elendt*, individuāls paziņojums). Testēšanas šķīdumu nevajadzētu sagatavot saskaņā ar *Elendt* un *Bias* (1990. gads), jo $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 un K_2HPO_4 koncentrācijas, kas norādītas rezerves šķīdumu sagatavošanai, ir nepiemērotas.

M7 barotnes sagatavošana

13. Katru rezerves šķīdumu (I) sagatavo atsevišķi un apvienoto rezerves šķīdumu (II) pagatavo no šiem rezerves šķīdumiem (I) (sk. 1. tabulu). 50 mililitrus apvienotā rezerves šķīduma (II) un 2. tabulā norādītos daudzumus no katra makrobarības rezerves šķīduma iemaisa vienā litrā dejonizēta ūdens, lai sagatavotu M7 barotni. Vitamīnu rezerves šķīdumu sagatavo, pievienojot trīs vitamīnus dejonizētam ūdenim, kā norādīts 3. tabulā, un neilgi pirms izmantošanas galīgajai M7 barotnei pievieno 0,1 ml apvienotā vitamīnu rezerves šķīduma. (Vitamīnu rezerves šķīdumu glabā sasaldētu mazos alikvotos.) Barotnei nodrošina aerāciju un to stabilizē.

1. tabula

Barotnes M4 un M7 mikroelementu rezerves šķīdumi

Rezerves šķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto rezerves šķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos rezerves šķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos (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**

Rezerves šķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto rezerves šķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos rezerves šķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos (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
Na2EDTA $\cdot 2 H_2O$ (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) Šīs vielas atšķiras M4 barotnē un M7 barotnē, kā norādīts iepriekš.
(2) Šos šķīdumus sagatavo atsevišķi un pēc tam salej kopā, un nekavējoties liek autoklāvā.

2. tabula

Makrobarības rezerves šķīdumi barotnei M4 un M7

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makrobarības rezerves šķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos M4 un 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**

3. tabula

Vitamīnu rezerves šķīdums barotnei M4 un M7

Visus trīs vitamīnu šķīdumus apvieno, lai sagatavotu vienu vitamīnu rezerves šķīdumu.

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Vitamīnu rezerves šķīduma tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
Tiamīna hidrohlorīds	750	0,1	0,075
Ciānkobalamīns (B12)	10	0,1	0,0010
Biotīns	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

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. papildinājums

IZSTRĀDĀTU NOSĒDUMU SAGATAVOŠANA

Nosēdumu sastāvs

Izstrādāto nosēdumu sastāvam jābūt šādam:

Sastāvdaļa	Raksturlielumi	% no nosēdumu saussvara
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, kuras pH ir pēc iespējas tuvāk 5,5–6,0 vērtībai, bez redzamām augu atliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs: ≤ 1 mm) un izžāvēta ar gaisu	4–5
Kvarca smiltis	Smilšu graudu izmērs: > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā	75–76
Kaolīna māli	Kaolinīta saturs: ≥ 30 %	20
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdru un smiltis	2 (± 0,5)
Kalcija karbonāts	$CaCO_3$, pulverizēts, ķīmiski tīrs	0,05-0,1
Ūdens	Vadītspēja: ≤ 10 μS/cm	30-50

Sagatavošana

Kūdru izžāvē gaisā un samaļ smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH koriģē ar $CaCO_3$ līdz 5,5 ± 0,5 vērtībai. Suspensiju kondicionē vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobu sastāvdaļu. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt 6,0 ± 0,5. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu homogēnus nosēdumus ar ūdens saturu 30–50 % diapazonā no nosēdumu sausā svara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un to koriģē 6,5–7,5 vērtībā ar $CaCO_3$, ja vajadzīgs. Ņem nosēdumu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Pēc tam, pirms izstrādātos nosēdumus izmanto hironomīdu toksicitātes testēšanā, ir ieteicams tos kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi būs testā.

Glabāšana

Mākslīgo nosēdumu sausās sastāvdaļas var arī uzglabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Izstrādātos (mitros) nosēdumus nedrīkstētu uzglabāt pirms to izmantošanas testā. Tie ir jāizmanto tūlīt pēc septiņu dienu kondicionēšanas perioda, kas pabeidz to sagatavošanu.

LITERATŪRA:

Šā pielikuma C.8. nodaļa “Toksicitātes noteikšana sliekām”.

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. papildinājums

Atšķaidīšanai piemērota ūdens ķīmiskie raksturlielumi

Viela	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 μg/l
Cietība kā $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Atlikumu hlors	< 10 μg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenīlu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

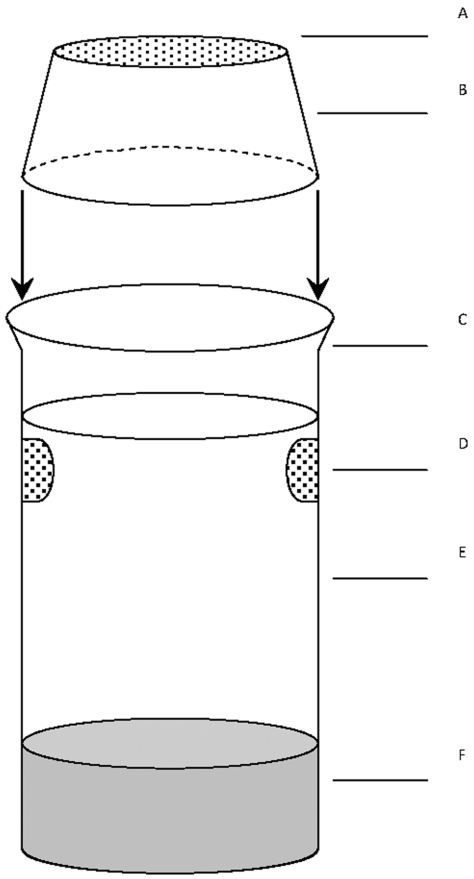
(*) Tomēr jānorāda, ka, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4).

▼M4

5. papildinājums

Norādījumi par hironomīdu kāpuru šķilšanās uzraudzību

Uz testēšanas vārglāzēm izvieto izšķilšanās slazdus. Šie slazdi ir nepieciešami, sākot no 20. dienas līdz testēšanas beigām. Turpmāk ir attēlots izmantotā slazda paraugs.



A.: Neilona aizsegs

B.: Apgāzts plastmasas trauks

C.: Bezlūpu ekspozīcijas vārglāze

D.: Ūdens apmaiņas aizsega lūkas

E.: Ūdens

F.: Nosēdumi

▼M4

C.29. VIEGLAS BIONOĀRDĪŠANĀS SPĒJA – CO_2 HERMĒTISKI NOSLĒGTOS TRAUKOS (BRĪVĀ TILPUMA TESTS)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – *TG*) 310 (2006. gads). Šī testēšanas metode ir skrīninga metode, ko izmanto, lai novērtētu ķīmisko vielu bionoārdīšanās spēju, un kas nodrošina līdzīgu informāciju, kādu var iegūt sešās testēšanas metodēs, kuras aprakstītas šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļā. Tāpēc ķīmisku vielu, kas uzrāda pozitīvus rezultātus saskaņā ar šo testēšanas metodi, var uzskatīt par viegli bionoārdāmu un tātad ātri noārdāmu vidē.

2. Parasti mazšķīstošu un spēcīgi adsorbējošu ķīmisko vielu testēšanai kā pirmo izvēlas iedibināto oglekļa dioksīda (CO_2) metodi (1), kuras pamatā ir *Sturm* sākotnējais tests (2), ar ko novērtē organisku ķīmisko vielu bionoārdīšanos, mērot oglekļa dioksīdu, kuru rada mikrobu darbība. To izvēlas arī šķīstošām (bet ne gaistošām) ķīmiskajām vielām, jo tiek plaši uzskatīts, ka oglekļa dioksīda veidošanās ir vienīgais neapšaubāmais mikrobu darbības pierādījums. Izšķīdušā organiskā oglekļa piesaisti var veicināt fizikālie un ķīmiskie procesi, proti, adsorbcija, izgaišana, nogulsnēšanās, hidrolīze, kā arī mikrobu darbība, un daudzas nebioloģiskas reakcijas patērē skābekli. CO_2 no organiskām ķīmiskajām vielām reti kad veidojas abiotiski. Sākotnējā un modificētajā *Sturm* testā (1) (2) CO_2 tiek piesaistīts šķidrajā fāzē un pārvietots uz absorbējošajiem traukiem ar smidzināšanu (t. i., gaisa burbuļiem, kas apstrādāti tā, lai tie šķidrumā piesaistītu CO_2), savukārt saskaņā ar *Larson* pieeju (3) (4) CO_2 tiek pārvietots no reakcijas trauka uz absorbētājiem, cauri brīvajam tilpumam laižot gaisu bez CO_2 un papildus nepārtraukti kratot testēšanas trauku. Reakcijas trauku krata tikai saskaņā ar *Larson* modificēto pieeju. Maisīšana ir noteikta vienīgi nešķīstošām vielām ISO 9439 (5) un sākotnējā ASV redakcijā (6), un abos minētajos dokumentos ir norādīta smidzināšana, nevis brīvā tilpuma aizvietošana. Saskaņā ar citu oficiālu ASV *EPA* metodi (7), kuras pamatā ir *Gledhill* metode (8), kratīto reakcijas trauku noslēdz, nepieļaujot gaisa piekļuvi, un radušos CO_2 savāc iekšējā alkalīna uztvērējā tieši no gāzes fāzes tāpat kā klasiskajās *Warburg/Barcroft* respirometra kolbās.

3. Savukārt attiecībā uz neorganisku oglekli ir pierādīts, ka vairāku ķīmisko vielu gadījumā tas akumulējas barotnē, piemērojot standarta modificēto *Sturm* testu (9). Noārdoties 20 mg C/l anilīna, tika konstatēta neorganiskā oglekļa koncentrācija līdz 8 mg/l apmērā. Tādējādi CO_2 savākšana alkalīna uztvērējos nenodrošināja patiesu atspoguļojumu par kopējo CO_2 daudzumu, kas radies mikrobioloģiski visā noārdīšanās laikā. Rezultātā nosacījums, ka "10 dienu laikposmā" (10 dienas tūlīt pēc tam, kad ir sasniegta bionoārdīšanās 10 % apmērā) ir jāsavāc > 60 % no teorētiski radītā maksimālā CO_2 (turpmāk – $ThCO_2$), lai testējamo ķīmisko vielu varētu klasificēt kā viegli bionoārdāmu vielu, netiks izpildīts attiecībā uz dažām ķīmiskajām vielām, kuras būtu klasificētas kā viegli bionoārdāmas, ja izmantotu izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – *DOC*) noārdīšanos.

4. Ja noārdīšanās īpatsvars ir mazāks, nekā prognozēts, iespējams, ka neorganiskais ogleklis akumulējas testēšanas šķīdumā. Tādā gadījumā noārdīšanos var novērtēt ar citiem vieglas bionoārdīšanās testiem.

▼M4

5. Citu *Sturm* metodikas trūkumu (sarežģīta, ilgstoša procedūra, kurā pastāv lielāka eksperimentālu kļūdu iespēja un kura nav izmantojama gaistošām ķīmiskajām vielām) dēļ tika piemēroti centieni, lai papildus *Gledhill* sāktu izmantot citus hermētiski noslēgtu trauku paņēmienus, nevis gāzes caurplūdi (10) (11). *Boatman et al.* (12) pārskatīja iepriekšējās metodes un pieņēma noslēgta brīvā tilpuma sistēmu, kurā inkubācijas beigās CO_2 izlaiž brīvajā tilpumā, izmantojot barotnes paskābināšanu. CO_2 mērīja ar gāzu hromatogrāfijas/neorganiskā oglekļa analīzi automātiski paņemtos paraugos no brīvā tilpuma, bet netika ņemts vērā izšķīdušais neorganiskais ogleklis (turpmāk – *DIC*) šķidrajā fāzē. Turklāt izmantotie trauki bija ļoti mazi (20 ml) un saturēja tikai 10 ml barotnes, kas radīja problēmas, piemēram, kad bija obligāti jāpievieno ļoti mazi daudzumi nešķīstošu testējamo ķīmisko vielu, un/vai barotnē ar sējmateriālu varēja trūkt vai vispār nebūt mikroorganismu, kuri spētu noārdīt testējamās ķīmiskās vielas.

6. Minētās problēmas ir pārvarētas neatkarīgos *Struijs* un *Stoltenkamp* (13) un *Birch* un *Fletcher* (14) pētījumos. *Birch* un *Fletcher* pētījumu pamatā bija šo autoru pieredze ar iekārtu, ko izmanto anaerobās bionoārdīšanās testā (15). Pirmajā minētajā metodē (13) CO_2 mēra brīvajā tilpumā pēc paskābināšanas un līdzsvara iestāšanās, savukārt otrajā (14) mēra *DIC* gan gāzes fāzē, gan šķidrajā fāzē, neveicot apstrādi. Šķidrajā fāzē konstatēja vairāk nekā 90 % radušās neorganiskā oglekļa. Abas metodes nodrošināja priekšrocības salīdzinājumā ar *Sturm* testu, jo to testēšanas sistēma bija kompaktāka un vieglāk pārvaldāma, ar tām var testēt gaistošas ķīmiskās vielas un var novērst radušās CO_2 mērīšanas kavēšanos.

7. Abas pieejas apvienoja *ISO* Brīvā tilpuma CO_2 standartā (16), kam veica salīdzinošo izpēti (17), un tieši šis standarts ir šīs testēšanas metodes pamatā. Līdzīgā veidā šīs abas pieejas ir izmantotas ASV *EPA* metodē (18). Saskaņā ar ieteikumiem ir izmantojamas divas CO_2 mērīšanas metodes, proti, mēra CO_2 brīvajā tilpumā pēc paskābināšanas (13) un neorganisko oglekli šķidrajā fāzē pēc pārsātināšanas ar sārmu. Otro minēto metodi ieviesa *Peterson* šīs brīvā tilpuma metodes, kura bija pielāgota potenciālās bionoārdīšanās noteikšanai, *CONCAWE* salīdzinošās izpētes laikā (19). Izmaiņas, kas ieviestas šā pielikuma C.4. nodaļas vieglās bionoārdīšanās noteikšanas metožu 1992. gada (20) pārskatīšanas laikā, ir ieviestas arī šajā testēšanas metodē, lai apstākļi (barotne, ilgums utt.) būtu tādi paši kā pārskatītajā *Sturm* testā (20). *Birch* un *Fletcher* (14) ir parādījuši, ka ar šo brīvā tilpuma testu iegūst ļoti līdzīgus rezultātus tiem, ko ar tām pašām ķīmiskajām vielām ieguva ESAO veiktajā pārskatīto testēšanas metožu salīdzinošajā izpētē (21).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

8. Testējamo ķīmisko vielu, parasti 20 mg C/l, kā vienīgo oglekļa un enerģijas avotu inkubē minerālsāļu buferšķīdumā, kas ir apsēts ar jauktu mikroorganismu populāciju. Testēšanu veic hermētiski noslēgtās pudelēs ar brīvo tilpumu, kurā atrodas gaiss, kas nodrošina skābekļa rezervuāru aerobas bionoārdīšanās vajadzībām. CO_2 veidošanos, ko izraisa testējamās ķīmiskās vielas galīgā aerobā bionoārdīšanās, nosaka, izmērot, cik lielā mērā neorganiskā oglekļa daudzums testa pudelēs pārsniedz neorganiskā oglekļa daudzumu tukšajos traukos, kas satur tikai barotni ar sējmateriālu. Bionoārdīšanās pakāpi izsaka kā īpatsvaru no teorētiski radītā maksimālā neorganiskā oglekļa (turpmāk – *ThIC*), pamatojoties uz sākotnēji pievienoto testējamās ķīmiskās vielas daudzumu (kā organisko oglekli).

9. Var noteikt arī *DOC* piesaisti un/vai testējamās ķīmiskās vielas primārās bionoārdīšanās pakāpi (20).

▼M4

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

10. Lai noteiktu noārdīšanās pakāpi, jāzina testējamās ķīmiskās vielas organiskā oglekļa saturs (masas %), kuru nosaka vai nu pēc ķīmiskās struktūras, vai izmērot. Lai noteiktu piemērotu brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību gaistošām testējamām ķīmiskajām vielām, noder izmērīta vai aprēķināta Henrija likuma konstante. Informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti attiecībā uz mikroorganismiem ir lietderīga, lai izraudzītos atbilstīgu testēšanas koncentrāciju un lai interpretētu vājas bionoārdīšanās spējas rezultātus, proti, ir ieteicams ietvert inhibēšanas pārbaudi, ja vien nav zināms, ka testējamā ķīmiskā viela nav inhibējoša attiecībā uz mikrobu darbību (sk. 24. punktu).

METODES PIEMĒROTĪBA

11. Tests ir piemērojams ūdenī šķīstošām un arī nešķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām, bet ir jānodrošina laba testējamās ķīmiskās vielas dispersija. Izmantojot ieteikto brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību 1:2, var testēt gaistošas ķīmiskās vielas, kuru Henrija likuma konstante nepārsniedz 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, jo testējamās ķīmiskās vielas daļa brīvajā tilpumā nepārsniegs 1 % (13). Var izmantot mazāku brīvo tilpumu, ja testē ķīmiskās vielas, kuru gaistamība ir lielāka, bet kuru bioloģiskā pieejamība var būt ierobežota, it sevišķi, ja tās ir ūdenī mazšķīstošas. Tomēr lietotājiem ir jānodrošina, ka brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecība un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir tāda, ka ir pieejams pietiekams skābekļa daudzums, kas pieļautu pilnīgu aerobu bionoārdīšanos (piemēram, nav ieteicama augsta substrāta koncentrācija un mazs brīvais tilpums). Norādījumi par šo jautājumu ir pieejami atsaucē (13) un (23).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

12. Lai pārbaudītu testēšanas procedūru, paralēli ir jātestē ķīmiskā standartviela ar zināmu bionoārdīšanās spēju. Šim nolūkam var izmantot anilīnu, nātrija benzoātu vai etilēnglikolu, ja testē ūdenī šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas, un 1-oktanolu, ja testē mazšķīstošas testējamās ķīmiskās vielas (13). Šo ķīmisko vielu *ThIC* bionoārdīšanās pakāpei 14 dienu laikā jāsasniedz > 60 %.

ATKĀRTOJAMĪBA

13. *ISO* veiktajā metodes salīdzinošajā izpētē (17), kurā nodrošināja ieteiktos apstākļus, tostarp testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju 20 mg C/l, tika iegūti turpmāk norādītie rezultāti.

Testējamā ķīmiskā viela	Vidējais bionoārdīšanās īpatsvars (28 dienās)	Mainības koeficients (%)	Laboratoriju skaits
Anilīns	90	16	17
1-oktanols	85	12	14

Izmantojot anilīnu, mainība (atkārtojamība) viena testa ietvaros bija zema, mainības koeficientiem nepārsniedzot 5 % gandrīz visās testēšanas sērijās. Divos gadījumos, kuros atkārtojamība bija zemāka, lielāka mainība, iespējams, tika novērota augsta radītā neorganiskā oglekļa līmeņa dēļ tukšajos traukos. Testos ar 1-oktanolu atkārtojamība bija sliktāka, bet joprojām zem desmit procentiem 79 % testēšanas sēriju. Šī paaugstinātā mainība viena testa ietvaros varētu būt attiecināma uz dozēšanas kļūdām, jo hermētiski noslēgtajās testēšanas pudelēs bija jāinjicē neliels daudzums (3–4 µl) 1-oktanola. Augstākus mainības koeficientus iegūtu pie testējamās ķīmiskās vielas mazākām koncentrācijām, it sevišķi pie koncentrācijām zem 10 mg C/l. To daļēji varētu novērst, samazinot kopējā neorganiskā oglekļa (turpmāk – *TIC*) koncentrāciju sējmateriālā.

▼M4

14. ES salīdzinošajā izpētē (24) par piecām virsmaktīvajām vielām, ko pievieno koncentrācijā 10 mg C/l, ieguva turpmāk norādītos rezultātus.

Testējamā ķīmiskā viela	Vidējais bionoārdīšanās īpatsvars (28 dienās)	Mainības koeficients (%)	Laboratoriju skaits
Tetrapropilēnbenzolsulfonāts	17	45	10
Diizooktilsulfosuk-cināts (anjonu)	72	22	9
Heksadeciltrimetil- (*) amonija hlorīds (katjonu)	75	13	10
Izononilfenol(etoksilāts)$_9$ (nejonu)	41	32	10
Kokamīdpropildimetilhidroksisulfobetaīns (amfotērs)	60	23	11

(*) Tika pievienots SiO_2, lai neitralizētu toksicitāti.

Rezultāti parāda, ka kopumā mainība bija augstāka attiecībā uz virsmaktīvajām vielām ar vājāku labas noārdīšanās spēju. Mainība viena testa ietvaros bija zem 15 % vairāk nekā 90 % gadījumu, augstākajam līmenim sasniedzot 30–40 %.

PIEZĪME. Lielākā daļa virsmaktīvo vielu nav vienkāršas molekulāras vielas, bet gan ir izomēru, homologu utt. maisījumi, kam ir raksturīgi atšķirīgi noārdīšanās kavējuma periodi un atšķirīgi kinētiskie koeficienti, un tā rezultātā veidojas neskaidras, vāji izteiktas līknes, tāpēc vajadzīgā 60 % apstiprināšanas vērtība "10 dienu laikposmā" var palikt nesasniegta, pat ja katra atsevišķā molekulārā struktūra sasniegtu > 60 % 10 dienu laikā, ja to testētu atsevišķi. To var novērot arī citos sarežģītos maisījumos.

METODES APRAKSTS

Iekārta

15. Parastās laboratorijas iekārtas un:

a) stikla seruma pudeles, kas hermētiski noslēgtas ar butilgumijas aizbāžņiem un gofrētiem alumīnija vāciņiem; ieteicamais izmērs ir 125 ml, kura kopējais tilpums ir aptuveni 160 ml (tādā gadījumā katras pudeles tilpumam jābūt 160 ± 1 ml); var izmantot mazāka izmēra trauku, ja rezultāti atbilst 66. un 67. punktā aprakstītajiem nosacījumiem;

b) oglekļa analizators vai cits instruments (piemēram, gāzes hromatogrāfs), ar ko varētu mērīt neorganisko oglekli;

▼M4

c) šļirces ar augstu precizitātes pakāpi gāzveida un šķidrajiem paraugiem;

d) orbitālais kratītājs termostatējamā vidē;

e) gaisa bez CO_2 piegāde – to var sagatavot, gaisu laižot cauri natronkaļķa granulām vai izmantojot 80 % N_2/20 % O_2 gāzu maisījumu (fakultatīvi) (sk. 28. punktu);

f) membrānfiltrēšanas ierīce ar 0,20–0,45 μm porām (fakultatīvi);

g) organiskā oglekļa analizators (fakultatīvi).

Reaģenti

16. Visā testēšanā jāizmanto analītiski tīri reaģenti.

Ūdens

17. Jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, kura organiskā oglekļa kopējais saturs ir ≤ 1 mg/l. Tas veido ≤ 5 % no sākotnējā organiskā oglekļa satura, kas pievienots ar ieteikto testējamās ķīmiskās vielas devu.

Minerālsāļu barotnes rezerves šķīdumi

18. Minerālsāļu barotnes rezerves šķīdumi ir līdzīgi šķīdumiem, kas noteikti ISO 14593 (16) un C.4. nodaļas vieglas bionoārdīšanās testiem (20). Amonija hlorīda augstāka koncentrācija (2,0 g/l apmērā 0,5 g/l vietā) jāizmanto tikai izņēmuma gadījumos, piemēram, kad testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir > 40 mg C/l. Rezerves šķīdumi ir jāglabā ledusskapī un no tiem jāatbrīvojas pēc sešiem mēnešiem vai ātrāk, ja ir novērota nogulsnēšanās vai mikrobu vairošanās. Jāsagatavo šādi rezerves šķīdumi:

a) kālija dihidrogēnfosfāts (KH_2PO_4) 8,50 g,

dikālija hidrogēnfosfāts (K_2HPO_4) 21,75 g,

dinātrija hidrogēnfosfāta dihidrāts ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g,

amonija hlorīds (NH_4Cl) 0,50 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam; šā šķīduma pH jābūt 7,4 (± 0,2); ja tas tā nav, jāsagatavo jauns šķīdums;

b) kalcija hlorīda dihidrāts ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam;

c) magnija sulfāta heptahidrāts ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam;

d) dzelzs (III) hlorīda heksahidrāts ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam un kam jāpievieno viens piliens koncentrētas HCl.

Minerālbarotņu sagatavošana

19. Jāsajauc 10 ml a) apakšpunkta šķīduma ar aptuveni 800 ml ūdens (17. punkts), jāpievieno pa 1 ml no b), c) un d) apakšpunktā norādītajiem šķīdumiem un jāpapildina tilpumā līdz 1 litram, pievienojot ūdeni (17. punkts).

Citi reaģenti

20. Koncentrēta ortofosforskābe (H_3PO_4) (> 85 % masas uz tilpumu).

▼M4

Nātrija hidroksīda šķīdums 7M

21. Jāizšķīdina 280 g nātrija hidroksīda (NaOH) vienā litrā ūdens (17. punkts). Jānosaka šā šķīduma *DIC* koncentrācija, un šī vērtība jāņem vērā, aprēķinot testēšanas rezultātu (sk. 55. un 61. punktu), it sevišķi saistībā ar 66. punkta b) apakšpunktā noteikto derīguma kritēriju. Ja *DIC* koncentrācija ir pārāk augsta, jāsagatavo svaigs šķīdums.

Testējamā ķīmiskā viela

22. Jāsagatavo rezerves šķīdums no ūdenī pietiekami šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas un ūdens (17. punkts) vai testēšanas barotnes (19. punkts) koncentrācijā, kam vēlams būt 100 reizes augstākai nekā galīgajai koncentrācijai, ko izmantos testēšanā. Var būt nepieciešams koriģēt rezerves šķīduma pH. Rezerves šķīdums ir jāpievieno minerālbarotnei, lai galīgā organiskā oglekļa koncentrācija būtu 2–40 mg C/l diapazonā, vēlams, 20 mg C/l. Ja izmanto zemākas koncentrācijas, var būt apdraudēta iegūtā precizitāte. Šķīstošas un nešķīstošas šķidras ķīmiskās vielas traukos var pievienot tieši, izmantojot augstas precizitātes šļirces. Mazšķīstošām un nešķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām var būt vajadzīga īpaša apstrāde (25). Ir šādas izvēles:

a) zināmu nosvērtu daudzumu tieša pievienošana;

b) ultraskaņas dispersija pirms pievienošanas;

c) dispersija ar emulgatoru palīdzību, kas ir vajadzīga, lai pirms pievienošanas noteiktu, vai testējamām ķīmiskajām vielām ir jebkāda inhibējoša vai stimulējoša ietekme uz mikrobu darbību;

d) šķidru testējamo ķīmisko vielu adsorbcija vai šķīdums piemērotā gaistošā šķīdinātājā uz inertu barotni vai balstu (piemēram, stikla šķiedras filtru), kam seko šķīdinātāja iztvaikošana, ja tādu izmantoja, un zināmu daudzumu tieša pievienošana;

e) zināma daudzuma testējamās ķīmiskās vielas šķīduma viegli gaistošā šķīdinātājā pievienošana tukšam testēšanas traukam, kam seko šķīdinātāja iztvaikošana.

Preparāti vai šķīdinātāji, kas izmantoti c), d) un e) apakšpunktā, ir jātestē, lai noteiktu to stimulējošo vai inhibējošo ietekmi uz mikrobu darbību (sk. 42. punkta b) apakšpunktu).

Ķīmiskā standartviela

23. Jāsagatavo (šķīstošas) ķīmiskās standartvielas rezerves šķīdums ūdenī (17. punkts) koncentrācijā, kam vēlams būt 100 reizes augstākai nekā galīgajai koncentrācijai, ko izmantos testēšanā (20 mg C/l).

Inhibējošas ietekmes pārbaude

24. Testējamās ķīmiskās vielas nereti neuzrāda nekādu ievērojamu noārdīšanos apstākļos, ko izmanto vieglas bionoārdīšanās novērtējumos. Viens no iespējamiem iemesliem ir tas, ka testējamai ķīmiskajai vielai testēšanā izmantotajā koncentrācijā ir inhibējoša ietekme uz sējmateriālu. Inhibējošas ietekmes pārbaudi var ietvert testēšanas plānā, lai atvieglotu inhibēšanas identificēšanu (retrospektīvi) kā iespējamo cēloni vai veicinošu faktoru. Alternatīvā gadījumā inhibējošās ietekmes pārbaude var izslēgt šādus traucējumus un parādīt, ka nekāda vai neliela noārdīšanās ir attiecināma vienīgi uz mikrobu darbības neiespējamību attiecīgajos testēšanas apstākļos. Lai iegūtu informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti attiecībā uz (aerobiem) mikroorganismiem, jāpagatavo šķīdums testēšanas barotnē, kas satur testējamo ķīmisko vielu un ķīmisko standartvielu (19. punkts), katru attiecīgi tādā koncentrācijā, kādā pievienota (sk. 22. un 23. punktu).

▼M4

Sējmateriāls

25. Sējmateriālu var iegūt no dažādiem avotiem, proti, no aktīvajām dūņām, attīrītiem notekūdeņiem (bez hlora), virszemes ūdeņiem un augsnēm vai iepriekš minēto maisījuma (20). Izmantojot ķīmisko standartvielu, jāpārbauda avota bionoārdīšanās aktivitāte. Neatkarīgi no avota nedrīkstētu izmantot mikroorganismus, kas iepriekš pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai, ja procedūru izmantos kā vieglas bionoārdīšanās testu.

Brīdinājums. Aktīvās dūņas, notekūdeņi un attīrīti notekūdeņi satur patogēnus organismus, un ar tiem jārīkojas piesardzīgi.

26. Pamatojoties uz pieredzi, sējmateriāla optimālais daudzums ir tāds, kas:

— ir pietiekams, lai nodrošinātu atbilstīgu bionoārdīšanās darbību,

— noārda paredzēto īpatsvaru ķīmiskās standartvielas (sk. 66. punktu),

— nodrošina 10^2–10^5 koloniju veidošanas vienību katrā galīgā maisījuma mililitrā,

— parasti nodrošina suspendēto cieto daļiņu koncentrāciju 4 mg/l apmērā galīgajā maisījumā, ja izmanto aktīvās dūņas; var izmantot koncentrācijas līdz 30 mg/l apmērā, bet tās var būtiski palielināt CO_2 veidošanos tukšajos traukos (26),

— par mazāk nekā 10 % papildina organiskā oglekļa sākotnējo koncentrāciju, ko nodrošināja ar testējamo ķīmisko vielu,

— parasti ir 1–10 ml sējmateriāla 1 litrā testēšanas šķīduma.

Aktīvās dūņas

27. Svaigas aktīvās dūņas tiek savāktas no aerācijas tvertnes notekūdeņu attīrīšanas iekārtā vai laboratorijas blokā, kas galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Ja vajadzīgs, rupjās daļiņas izvāc, veicot sijāšanu (piemēram, izmantojot sietu ar 1 mm^2 acu izmēru), un dūņas līdz to izmantošanai ir jāuztur aerobas.

28. Pēc rupjo daļiņu izvākšanas dūņām var arī ļaut nogulsnēties vai tās var centrifugēt (piemēram, 1 100 × g uz 10 minūtēm). Dzidrais šķīdums ir jāizlej. Dūņas var noskalot ar minerālu šķīdumu. Koncentrētās dūņas jāsuspendē minerālbarotnē, lai iegūtu suspendēto daļiņu koncentrāciju 3–5 g suspendēto daļiņu/l apmērā, un dūņas līdz to izmantošanai ir jāuztur aerobas.

29. Dūņas jāņem no pienācīgi funkcionējošas tradicionālas attīrīšanas iekārtas. Ja dūņas jāņem no attīrīšanas iekārtas, kas darbojas ar lielu jaudu, vai ja ir aizdomas, ka dūņas satur inhibitorus, tās ir jāmazgā. Pēc rūpīgas samaisīšanas atkārtoti suspendētajām dūņām ļauj nogulsnēties vai tās centrifugē, atbrīvojas no dzidrā šķīduma un nomazgātās dūņas atkal suspendē papildu daudzumā minerālbarotnes. Šī procedūra ir jāatkārto, līdz dūņas uzskatāmas par attīrītām no substrātu vai inhibitoru pārpalikumiem.

30. Pēc pilnīgas atkārtotas suspensijas panākšanas vai neattīrītu dūņu gadījumā jāpaņem paraugs tieši pirms izmantošanas, lai noteiktu suspendēto cieto daļiņu sauso svaru.

31. Aktīvās dūņas var arī homogenizēt (3–5 g suspendēto daļiņu/l). Dūņas ir divas minūtes jāmaisa *Waring* jaucējā ar vidēju ātrumu. Samaisītajām dūņām ļauj 30 minūtes vai, ja vajadzīgs, ilgāk nogulsnēties un šķidrumu dekantē izmantošanai par sējmateriālu aptuveni 10 ml/l minerālbarotnes apmērā.

▼M4

32. Vēl vairāk CO_2 veidošanos tukšajos traukos var samazināt, aerējot dūņas uz nakti ar gaisu bez CO_2. Šajā testā kā sējmateriāla koncentrācija jāizmanto 4 mg/l aktīvo dūņu cieto daļiņu (13).

Sekundārs attīrītais notekūdens

33. Sējmateriālu var arī iegūt no sekundāra attīrīta notekūdens no attīrīšanas iekārtas vai laboratorijas bloka, kas galvenokārt saņem sadzīves notekūdeņus. Paraugs jāuzglabā aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā vai jākondicionē, ja vajadzīgs. Attīrītais notekūdens jāfiltrē cauri filtram ar rupjām porām, lai to atbrīvotu no lielām daļiņām, un ir jānosaka pH vērtība.

34. Lai samazinātu filtrāta neorganiskā oglekļa saturu, filtrātu apsmidzina ar gaisu bez CO_2 (15. punkta e) apakšpunkts) vienu stundu, vienlaikus uzturot pH 6,5 vērtībā ar ortofosforskābes palīdzību (20. punkts). pH vērtību atjauno tās sākotnējā vērtībā ar nātrija hidroksīda palīdzību (21. punkts), un aptuveni pēc vienas stundas nogulsnēšanās paņem piemērotu daudzumu dzidrā šķīduma, lai to izmantotu sējmateriālam. Šī smidzināšanas procedūra samazina sējmateriāla neorganiskā oglekļa saturu. Piemēram, ja par sējmateriālu izmantoja maksimālo ieteikto tilpumu filtrēta un apsmidzināta attīrītā notekūdens (100 ml) uz litru, neorganiskā oglekļa daudzums tukšos kontroles traukos bija 0,4–1,3 mg/l diapazonā (14), kas ir 2–6,5 % no testējamās ķīmiskās vielas oglekļa 20 mg C/l apmērā un 4–13 % – 10 mg C/l apmērā.

Virszemes ūdeņi

35. Ir jāpaņem atbilstīgu virszemes ūdeņu paraugs. Tas jātur aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā. Paraugs jākoncentrē, ja vajadzīgs, to filtrējot vai centrifugējot. Sējmateriāla daudzumam, ko izmanto katrā testēšanas traukā, ir jāatbilst 26. punktā norādītajiem kritērijiem.

Augsnes

36. Ir jāpaņem atbilstīgas augsnes paraugs, ko savāc 20 cm dziļumā zem augsnes virsmas. Akmeņi, augu atliekas un bezmugurkaulnieki ir jāizņem no augsnes parauga, pirms to sijā cauri sietam ar 2 mm acs izmēru (ja paraugs ir pārāk mitrs, lai to nekavējoties sijātu, daļēja žāvēšana ar gaisu palīdzēs to izsijāt). Paraugs jātur aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā (ja paraugu transportē vaļīgi aizsietā melna polietilēna maisiņā, to šajā maisiņā var uzglabāt 2–4 °C līdz vienam mēnesim).

Sējmateriāla iepriekšēja kondicionēšana

37. Sējmateriālu var iepriekš kondicionēt testēšanas apstākļiem, bet nedrīkst iepriekš adaptēt testējamai ķīmiskajai vielai. Iepriekšēja kondicionēšana var samazināt CO_2 veidošanos tukšajos traukos. Iepriekšēja kondicionēšana ietver aktīvo dūņu aerāciju pēc atšķaidīšanas testēšanas barotnē līdz 30 mg/l ar mitru gaisu bez CO_2 līdz 5–7 dienām testēšanas temperatūrā.

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA

Pudeļu skaits

38. Testēšanai vajadzīgo pudeļu skaits (15. punkta a) apakšpunkts) būs atkarīgs no analīžu regularitātes un testēšanas ilguma.

39. Ir ieteicams pēc tam, kad ir noteikts pietiekams skaits laika intervālu, piemēram, 10 dienu laikposms, katru reizi analizēt trīs pudeles. Turklāt testēšanas beigās analizē vismaz piecas testēšanas pudeles (15. punkta a) apakšpunkts) no a), b) un c) apakšpunkta kopumiem (sk. 42. punktu), lai nodrošinātu iespēju aprēķināt 95 % ticamības intervālus attiecībā uz vidējo bionoārdīšanās īpatsvara vērtību.

▼M4

Barotne ar sējmateriālu

40. Sējmateriālu izmanto aktīvo dūņu sausu cieto daļiņu koncentrācijā 4 mg/l. Tieši pirms izmantošanas ir jāsagatavo pietiekams daudzums barotnes ar sējmateriālu, piemēram, 2 ml atbilstīgi apstrādātu aktīvo dūņu (27.–32. punkts) koncentrācijā 2 000 mg/l pievienojot 1 litram minerālsāļu barotnes (19. punkts). Ja izmanto sekundāru attīrītu notekūdeni, jāpievieno līdz 100 ml attīrīta notekūdens (33. punkts) 900 ml minerālsāļu barotnes (19. punkts) un jāatšķaida līdz 1 litra tilpumam ar barotni.

Pudeļu sagatavošana

41. Barotnes ar sējmateriālu alikvoti ir jāiepilda atkārtojumu pudelēs, nodrošinot brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību 1:2 (piemēram, jāpievieno 107 ml pudelēs, kuru tilpums ir 160 ml). Var izmantot citas attiecības, bet jāņem vērā 11. punktā ietvertais brīdinājums. Izmantojot cita veida sējmateriālu, ir jāraugās, lai barotne ar sējmateriālu būtu pienācīgi samaisīta, lai nodrošinātu tās vienmērīgu izkliedi testēšanas pudelēs.

42. Sagatavo pudeļu kopumus (15. punkta a) apakšpunkts), nodrošinot:

a) testēšanas traukus (apzīmēti ar F_T), kuros ir testējamā ķīmiskā viela;

b) tukšus kontroles traukus (apzīmēti ar F_B), kuros ir tikai testēšanas barotne un sējmateriāls; jāpievieno arī ķīmiskās vielas, šķīdinātāji, preparāti vai stikla šķiedras filtri, ko izmanto, lai testēšanas traukos pievienotu testējamo ķīmisko vielu;

c) traukus (apzīmēti ar F_C), kuros ir ķīmiskā standartviela, lai pārbaudītu procedūru;

d) ja vajadzīgs, traukus (apzīmēti ar F_I), kuros ir gan testējamā ķīmiskā viela, gan ķīmiskā standartviela tādās pašās koncentrācijās (24. punkts) kā attiecīgi pudelēs F_T un F_C, lai pārbaudītu testējamās ķīmiskās vielas iespējamu inhibējošu ietekmi;

e) traukus (apzīmēti ar F_S), lai pārbaudītu iespējamu abiotisku noārdīšanos; šie trauki atbilst traukiem a) apakšpunktā, bet papildus satur 50 mg/l $HgCl_2$ vai ir sterilizēti citā veidā (piemēram, autoklāvā).

43. Ūdenī šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas un ķīmiskās standartvielas pievieno kā ūdenī pagatavotus rezerves šķīdumus (22., 23. un 24. punkts), lai nodrošinātu koncentrāciju 10–20 mg C/l apmērā.

44. Nešķīstošas testējamās ķīmiskās vielas un nešķīstošas ķīmiskās standartvielas pudelēs pievieno dažādos veidos (sk. 22. punkta a)–e) apakšpunktu) atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, proti, vai nu pirms, vai pēc barotnes ar sējmateriālu pievienošanas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas attīrīšanas metodes. Ja izmanto kādu no 22. punkta a)–e) apakšpunktā uzskaitītajām procedūrām, tukšās pudeles F_B (42. punkta b) apakšpunkts) ir jāapstrādā līdzīgā veidā, tikai izņemot testējamo ķīmisko vielu vai ķīmisko standartvielu.

45. Gaistošas testējamās ķīmiskās vielas jāinjicē hermētiski noslēgtajās pudelēs (47. punkts) ar mikrošļirci. Devu aprēķina no injicētā daudzuma un testējamās ķīmiskās vielas blīvuma.

46. Traukos jāpievieno ūdens, ja vajadzīgs, lai visos traukos būtu vienāds šķidruma tilpums. Jānodrošina, lai brīvā tilpuma un šķidruma attiecība (parasti 1:2) un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija būtu tādas, ka brīvajā tilpumā ir pieejams pietiekams daudzums skābekļa, lai būtu iespējama pilnīga bionoārdīšanās.

▼M4

47. Pēc tam visas pudeles hermētiski noslēdz, piemēram, ar butilgumijas aizbāžņiem un alumīnija vāciņiem. Gaistošas testējamās ķīmiskās vielas jāpievieno šajā posmā (45. punkts). Ja ir jāuzrauga testējamās ķīmiskās vielas *DOC* koncentrācijas samazināšanās, kā arī jāveic nulles laika analīzes saistībā ar sākotnējās neorganiskā oglekļa koncentrācijas (sterili kontroles trauki, 42. punkta e) apakšpunkts) vai citu vērtību noteikšanu, no testēšanas trauka ir jāpaņem atbilstīgs paraugs. Pēc tam atbrīvojas no testēšanas trauka un tā satura.

48. Hermētiski noslēgtās pudeles ievieto rotējošā kratītājā (15. punkta d) apakšpunkts) ar kratīšanas ātrumu, kas ir pietiekams, lai pudeles saturs tiktu uzturēts pienācīgi samaisīts un suspensijā (piemēram, 150–200 rpm), un inkubē tumsā 20 °C ± 1 °C.

Paraugu ņemšana

49. Paraugu ņemšanas pieeja būs atkarīga no testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās kavējuma perioda un kinētiskā ātruma. Paraugu ņemšanas dienā atbrīvojas no pudelēm, no kurām ņem paraugus analīzēm, un tam jānotiek vismaz reizi nedēļā vai biežāk (piemēram, divreiz nedēļā), ja ir vajadzīga pilnīgas noārdīšanās līkne. Vajadzīgo skaitu atkārtojumu pudeļu (F_T, F_B un F_C, kā arī F_I un F_S, ja tās izmanto) izņem no kratītāja (sk. 42. punktu). Testēšana parasti ilgst 28 dienas. Ja bionoārdīšanās līkne norāda, ka plato ir sasniegts, pirms pagājušas 28 dienas, testēšanu var pabeigt ātrāk. Analīzes veikšanai jāņem paraugi no piecām pudelēm, kas rezervētas testēšanas 28. dienai, un jāizmanto rezultāti, lai aprēķinātu bionoārdīšanās īpatsvara ticamības robežas vai mainības koeficientu. No pudelēm, kas paredzētas inhibējošas ietekmes un abiotiskas noārdīšanās pārbaudēm, paraugi nav jāņem tik bieži kā no pārējām pudelēm, pietiek ar paraugiem 1. un 28. dienā.

Neorganiskā oglekļa (IC) analīze

50. CO_2 veidošanos pudelēs nosaka, mērot neorganiskā oglekļa koncentrācijas palielināšanos inkubācijas laikā. Testēšanas laikā radītā neorganiskā oglekļa daudzuma mērīšanai ir pieejamas divas ieteicamas metodes, kas aprakstītas turpmāk. Tā kā šīs metodes var sniegt nedaudz atšķirīgus rezultātus, vienā testēšanas sērijā jāizmanto tikai viena no metodēm.

51. A metode tiek ieteikta gadījumā, ja barotne, visticamāk, satur, piemēram, stikla filtrpapīra atliekas un/vai nešķīstošu testējamo ķīmisko vielu. Šo analīzi var veikt, izmantojot gāzes hromatogrāfu, ja nav pieejams oglekļa analizators. Ir svarīgi, lai pudeles atrastos testēšanas vai līdzīgā temperatūrā, kad tiek analizēta brīvā tilpuma gāze. B metode var būt vieglāk izmantojama laboratorijās, kas neorganiskā oglekļa mērījumiem izmanto oglekļa analizatoru. Ir svarīgi, lai nātrija hidroksīda šķīdums (21. punkts), ko izmanto CO_2 pārveidošanai karbonātā, ir vai nu svaigi sagatavots, vai ir zināms tā neorganiskā oglekļa saturs, lai to varētu ņemt vērā, aprēķinot testēšanas rezultātus (sk. 66. punkta b) apakšpunktu).

A metode – paskābināšana līdz pH < 3 apmērā

52. Pirms katras analīžu sērijas neorganiskā oglekļa analizatoru kalibrē, izmantojot atbilstīgu neorganiskā oglekļa standartu (piemēram, 1 (masas) % CO_2, kas atrodas N_2). Koncentrētu ortofosforskābi (20. punkts) injicē caur katras paraugiem izmantotās pudeles aizbāzni, lai pazeminātu barotnes pH līdz < 3 (piemēram, 107 ml testēšanas barotnes pievieno 1 ml). Pudeles ievieto atpakaļ kratītājā. Pēc vienu stundu ilgas kratīšanas testēšanas temperatūrā pudeles izņem no kratītāja un no katras pudeles brīvā tilpuma paņem gāzes alikvotus (piemēram, 1 ml), ko injicē neorganiskā oglekļa analizatorā. Izmērītās neorganiskā oglekļa koncentrācijas reģistrē kā mg C/l.

▼M4

53. Šīs metodes princips ir tāds, ka pēc paskābināšanas līdz pH < 3 un līdzsvara iestāšanās 20 °C līdzsvara konstante CO_2 izkliedei starp šķidro un gāzes fāzi testēšanas pudelēs ir 1,0, ja to mēra kā koncentrāciju (13). Tas attiecībā uz testēšanas sistēmu ir jāpierāda vismaz vienu reizi. To dara, kā aprakstīts turpmāk.

Sagatavo pudeles, kurās ir 5 un 10 mg/l kā neorganiskais ogleklis, izmantojot bezūdens nātrija karbonāta (Na_2CO_3) šķīdumu ūdenī bez CO_2, kurš pagatavots, paskābinot ūdeni līdz pH 6,5 apmērā ar koncentrētu ortofosforskābi (20. punkts) un uz nakti apsmidzinot to ar gaisu bez CO_2, kā arī paaugstinot pH līdz neitrālam līmenim ar sārmiem. Nodrošina, ka brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecība ir tāda pati kā testēšanā (piemēram, 1:2). Paskābina un ļauj iestāties līdzsvaram, kā aprakstīts 52. punktā, un izmēra neorganiskā oglekļa koncentrācijas gan brīvajā tilpumā, gan šķidrajās fāzēs. Pārliecinās, ka abas koncentrācijas ir vienādas testēšanas kļūdas robežās. Ja tās nav vienādas, lietotājam ir jāpārskata procedūras. Šī neorganiskā oglekļa izkliedes starp šķidro un gāzes fāzi pārbaude nav jāveic katrā testēšanas reizē. To, iespējams, varētu veikt kalibrēšanas laikā.

54. Ja ir jānosaka *DOC* noārdīšanās (tikai ūdenī šķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām), paraugi jāņem no šķidrās fāzes no atsevišķām (nepaskābinātām) pudelēm, jāfiltrē cauri membrānai un jāinjicē *DOC* analizatorā. Šīs pudeles pēc vajadzības var izmantot citām analīzēm, lai noteiktu primāro bionoārdīšanos.

B metode – CO_2 pārvēršana karbonātā

55. Pirms katras analīžu sērijas neorganiskā oglekļa analizatoru kalibrē, izmantojot atbilstīgu standartu, piemēram, nātrija bikarbonāta šķīdumu ($NaHCO_3$) ūdenī bez CO_2 (sk. 53. punktu) 0–20 mg/l apmērā kā neorganisko oglekli. Nātrija hidroksīda šķīdumu (7M, 21. punkts) (piemēram, 1 ml pievieno 107 ml barotnes) injicē caur katras paraugiem izmantotās pudeles aizbāzni, un pudeles vienu stundu krata testēšanas temperatūrā. Jāizmanto tāds pats NaOH šķīdums visās pudelēs, no kurām ņem paraugus un pēc tam atbrīvojas konkrētajā dienā, bet nav obligāti jāizmanto tāds pats šķīdums visos paraugu ņemšanas gadījumos testēšanas laikā. Ja ir vajadzīgas absolūtās neorganiskā oglekļa vērtības no tukšajām pudelēm visos paraugu ņemšanas gadījumos, katru reizi, kad izmantos NaOH šķīdumu, būs jānosaka tā neorganiskais ogleklis. Pudeles izņem no kratītāja un ļauj nogulsnēties. Ar šļirci no katra trauka šķidrās fāzes iegūst piemērotus daudzumus (piemēram, 50–1 000 µl). Paraugus injicē neorganiskā oglekļa analizatorā un reģistrē neorganiskā oglekļa koncentrācijas. Jānodrošina, ka izmantotais analizators ir pienācīgi aprīkots, lai tas varētu analizēt ar šo metodi iegūtos alkalīna paraugus.

56. Šīs metodes princips ir tāds, ka pēc sārmu pievienošanas un kratīšanas neorganiskā oglekļa koncentrācija brīvajā tilpumā ir niecīga. Tas attiecībā uz testēšanas sistēmu ir jāpārbauda vismaz vienu reizi, izmantojot neorganiskā oglekļa standartus, pievienojot sārmus un ļaujot nogulsnēties, un pēc tam izmērot neorganiskā oglekļa koncentrāciju gan brīvajā tilpumā, gan šķidrajā fāzē (sk. 53. punktu). Koncentrācijai brīvajā tilpumā ir jābūt tuvu nulles vērtībai. Šī pārbaude par gandrīz pilnīgu CO_2 absorbciju nav jāveic katrā testēšanas reizē.

57. Ja ir jānosaka *DOC* noārdīšanās (tikai ūdenī šķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām), paraugi jāņem no šķidrās fāzes no atsevišķām pudelēm (kas nesatur sārmus), jāfiltrē cauri membrānai un jāinjicē *DOC* analizatorā. Šīs pudeles pēc vajadzības var izmantot citām analīzēm, lai noteiktu primāro bionoārdīšanos.

▼M4

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu aprēķināšana

58. Pieņemot 100 % testējamās ķīmiskās vielas mineralizāciju CO_2, *ThIC*, kas pārsniedz tukšajās kontroles pudelēs radīto, atbilst *TOC*, kurš pievienots katrā testēšanas pudelē testa sākumā, t. i.:

$$\mathrm{ThIC} = \mathrm{TOC}.$$

Neorganiskā oglekļa (*TIC*) kopējā masa (mg) katrā pudelē ir:

$$\begin{aligned}\mathrm{TIC} &= (\text{mg oglekļa šķidrumā} + \text{mg oglekļa brīvajā tilpumā}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H)\end{aligned} \qquad \text{1. vienādojums}$$

kur:

V_L = šķidruma tilpums pudelē (litri);

C_L = neorganiskā oglekļa koncentrācija šķidrumā (mg/l kā ogleklis);

V_H = brīvais tilpums (litri);

C_H = neorganiskā oglekļa koncentrācija brīvajā tilpumā (mg/l kā ogleklis).

Turpmāk 60. un 61. punktā ir aprakstīti *TIC* aprēķini divām analītiskajām metodēm, ko izmanto neorganiskā oglekļa mērīšanai šajā testā. Bionoārdīšanās īpatsvaru (% D) katrā gadījumā aprēķina šādi:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{2. vienādojums}$$

kur:

TIC_t = mg *TIC* testēšanas pudelē laikā t;

TIC_b = vidējais mg *TIC* tukšajās pudelēs laikā t;

TOC = mg *TOC*, kas sākotnēji pievienots testēšanas pudelē.

Bionoārdīšanās īpatsvaru (% D) aprēķina testēšanas (F_T), standartvielas (F_C) un, ja ir ietverta inhibēšanas uzraudzība, kontroles (F_I) pudelēm no attiecīgajiem *TIC* daudzumiem, kas izveidojušies līdz katrai paraugu ņemšanas reizei.

59. Ja *TIC* saturs sterilajās kontroles pudelēs (F_S) ir būtiski palielinājies testēšanas laikā, var secināt, ka ir notikusi testējamās ķīmiskās vielas abiotiska noārdīšanās, un tas ir jāņem vērā, aprēķinot D pēc 2. vienādojuma.

Paskābināšana līdz pH < 3 apmērā

60. Tā kā paskābināšana līdz pH < 3 apmērā un līdzsvarošana izlīdzina *TIC* koncentrāciju šķidrajā un gāzes fāzē, ir jāmēra tikai neorganiskā oglekļa koncentrācija gāzes fāzē. Tādējādi saskaņā ar 1. vienādojumu $\mathrm{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kur V_B seruma pudeles tilpums.

CO_2 pārvēršana karbonātā

61. Saskaņā ar šo metodi aprēķinus veic pēc 1. vienādojuma, bet ignorē niecīgo neorganiskā oglekļa daudzumu gāzes fāzē, proti, $V_H \times C_H = 0$ un $\mathrm{TIC} = V_L \times C_L$.

▼M4

Rezultātu izteikšana

62. Bionoārdīšanās līkni iegūst, grafiski attēlojot bionoārdīšanās (D) īpatsvaru attiecībā pret inkubēšanas laiku, un, ja iespējams, norāda kavējuma fāzi, bionoārdīšanās fāzi, 10 dienu laikposmu un plato fāzi, kas ir fāze, kurā ir sasniegta maksimālā noārdīšanās un kurā bionoārdīšanās līkne ir izlīdzinājusies. Ja ir iegūti salīdzināmi rezultāti paralēliem testēšanas traukiem F_T (< 20 % starpība), grafiski attēlo vidējo līkni (sk. 2. papildinājuma 1. attēlu). Ja nav iegūti, līknes attēlo grafiski katram traukam atsevišķi. Nosaka bionoārdīšanās īpatsvara vidējo vērtību plato fāzē vai novērtē augstāko vērtību (piemēram, ja līkne plato fāzē samazinās), bet ir svarīgi novērtēt, ka otrajā gadījumā vērtība nav "ārpus robežām". Šo bionoārdīšanās maksimālo līmeni kā "testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās pakāpi" norāda testēšanas pārskatā. Ja testēšanas trauku skaits bija nepietiekams, lai norādītu plato fāzi, vidējās vērtības aprēķināšanai izmanto pēdējā testēšanas dienā izmērītos datus. Ar šo pēdējo vērtību, kas ir piecu atkārtojumu vidējais lielums, norāda precizitāti, ar kādu ir noteikts bionoārdīšanās īpatsvars. Tāpat pārskatā ir jānorāda vērtība, kas iegūta 10 dienu laikposma beigās.

63. Tāpat grafiski attēlo ķīmiskās standartvielas (F_C) līkni un, ja tas ir ietverts, abiotiskās noārdīšanās pārbaudes (F_S) un inhibējošas ietekmes kontroles (F_I) līkni.

64. Reģistrē tukšajās kontroles pudelēs (F_B), kā arī pudelēs F_S (abiotiska pārbaude), ja šīs pudeles ir ietvertas testā, esošos *TIC* daudzumus.

65. Aprēķina F_I trauku D, pamatojoties uz teorētisko radīto neorganisko oglekli, ko prognozē vienīgi no standartsastāvdaļas maisījumā. Ja 28. dienā [(D_{FC} ([1]) – D_{FI} ([2])) / D_{FC}] × 100 > 25 %, var pieņemt, ka testējamā ķīmiskā viela inhibēja sējmateriāla darbību, un uz to var attiecināt D_{FT} zemās vērtības, kas iegūtas testēšanas apstākļos. Tādā gadījumā testēšanu varētu atkārtot, izmantojot zemāku testēšanas koncentrāciju un, vēlams, samazinot *DIC* sējmateriālā, kā arī samazinot *TIC* tukšajās kontroles pudelēs, jo pretējā gadījumā zemāka koncentrācija samazinās metodes precizitāti. Var arī izmantot citu sējmateriālu. Ja pudelē F_S (abiotiska pārbaude) ir novērots *TIC* daudzuma būtisks samazinājums (> 10 %), var būt notikuši abiotiski noārdīšanas procesi.

Rezultātu derīgums

▼M7

66. Testu uzskata par derīgu, ja:

a) vidējais noārdīšanās īpatsvars traukos F_C, kas satur standartķimikāliju, 14. inkubācijas dienā ir > 60 %; un

b) vidējais *TIC* daudzums tukšajās kontrolēs F_B testēšanas beigās ir > 3mg C/l.

Ja šie ierobežojumi netiek izpildīti, tests ir jāatkārto ar sējmateriālu no cita avota un/vai ir jāpārskata procedūras. Piemēram, ja problēmu rada liela daudzuma tukša *IC* veidošanās, jāievēro 27.–32. punktā aprakstītā procedūra.

([1]) Noārdīšanās īpatsvars traukos F_C, kas satur standartvielu.
([2]) Noārdīšanās īpatsvars traukos F_I.

▼M4

67. Ja testējamā ķīmiskā viela nesasniedz 60 % *ThIC* un ja tika pierādīts, ka tā nav inhibējoša (65. punkts), testēšanu varētu atkārtot ar sējmateriāla lielāku koncentrāciju (līdz 30 mg/l aktīvo dūņu un 100 ml attīrīta notekūdens/l) vai ar sējmateriālu no citiem avotiem, it sevišķi, ja noārdīšanās bija 20–60 % diapazonā.

Rezultātu interpretācija

68. Bionoārdīšanās > 60 % *ThIC* apmērā 10 dienu laikposmā šajā testā parāda, ka testējamā ķīmiskā viela ir viegli bionoārdāma aerobos apstākļos.

69. Ja netiek sasniegta derīgumam vajadzīgā 60 % *ThIC* vērtība, jānosaka pH vērtība barotnē pudelēs, kurās nav pievienota ne skābe, ne sārmi. Vērtība zem 6,5 varētu norādīt uz nitrificēšanos. Tādā gadījumā testēšana ir jāatkārto ar augstākas koncentrācijas buferšķīdumu.

Testēšanas pārskats

70. Jāsagatavo tabula ar % D vērtībām katrai testēšanas (F_T), standartvielas (F_C) un, ja tā ietverta, inhibēšanas kontroles pudelei (F_I) par katru dienu, kad ņemti paraugi. Ja atkārtojumu pudelēm tiek iegūti salīdzināmi rezultāti, ir grafiski jāattēlo vidējā % D attiecībā pret laiku. Jāreģistrē *TIC* daudzums tukšajās pudelēs (F_B) un sterilajās kontroles pudelēs (F_S), kā arī jāreģistrē *DOC* un/vai citas vērtības un to noārdīšanās īpatsvars.

71. Jānosaka % D vidējā vērtība plato fāzē vai jāizmanto augstākā vērtība, ja bionoārdīšanās līkne plato fāzē samazinās, un pārskatā tas jānorāda kā "testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās pakāpe". Ja izmanto augstāko vērtību, ir svarīgi nodrošināt, lai tā nebūtu "ārpus robežām".

72. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula un attiecīgās fizikālās un ķīmiskās īpašības,

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi).

Testēšanas apstākļi:

— atsauce uz šo testēšanas metodi,

— izmantotās testēšanas sistēmas apraksts (piemēram, trauka tilpums, brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecība, maisīšanas metode utt.),

— testējamās ķīmiskās vielas un ķīmiskās standartvielas pievienošana testēšanas sistēmai: testēšanā izmantotā koncentrācija un oglekļa daudzums, kas devās ievadīts katrā testēšanas pudelē, šķīdumu izmantošana,

— sīkas ziņas par izmantoto sējmateriālu, jebkādu iepriekšēju apstrādi un iepriekšēju kondicionēšanu,

— inkubācijas temperatūra,

— neorganiskā oglekļa analīzes principa validācija,

— neorganiskā oglekļa analizatora galvenie raksturlielumi (un jebkādas citas izmantotās analītiskās metodes),

— atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

— bionoārdīšanās izejas dati un aprēķinātās vērtības tabulas veidā,

▼M4

— grafiks ar noārdīšanās īpatsvaru attiecībā pret laiku gan testējamai ķīmiskajai vielai, gan ķīmiskajai standartvielai, kavējuma fāze, noārdīšanas fāze, 10 dienu laikposms un slīpums,

— noārdīšanās īpatsvars plato fāzē, testēšanas beigās un pēc 10 dienu laikposma,

— ikvienas testa rezultātu nepieņemšanas iemesls,

— jebkādi citi fakti, kas ir būtiski attiecībā uz piemēroto procedūru,

— rezultātu apspriešana.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana" – "CO_2 izdalīšanās tests (C.4.-C metode)".

(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 ($C0_2$ 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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana".

(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) Šā pielikuma C.11. nodaļa "Aktīvo dūņu respirācijas inhibīcijas tests".

(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. papildinājums

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

IC: neorganiskais ogleklis.

$ThCO_2$: teorētiskais oglekļa dioksīds (mg) ir aprēķinātais oglekļa dioksīda daudzums, kuram jāveidojas no zināma vai izmērīta oglekļa daudzuma, kas ir testējamās ķīmiskās vielas sastāvā, to pilnībā mineralizējot; izsaka arī miligramos oglekļa dioksīda, kas izdalās uz miligramu testējamās ķīmiskās vielas.

DOC: izšķīdušais organiskais ogleklis ir šķīdumā esošais organiskais ogleklis vai organiskais ogleklis, kas iziet cauri 0,45 mikrometru filtram vai paliek dzidrajā šķīdumā pēc 15 minūšu centrifugēšanas aptuveni 4 000 g apmērā (apm. 40 000 m/s^{-2}).

DIC: izšķīdušais neorganiskais ogleklis.

ThIC: teorētiskais neorganiskais ogleklis.

TIC: kopējais neorganiskais ogleklis.

Viegli bionoārdāmas: tādu ķīmisko vielu pieņemta klasifikācija, kas izturējušas konkrētus skrīninga testus attiecībā uz pilnīgu bionoārdīšanos; šie testi ir tik stingri, ka var pieņemt, ka šādas ķīmiskās vielas aerobos apstākļos ūdens vidē noārdīsies ātri un pilnībā.

10 dienu laikposms: 10 dienas tieši pēc 10 % bionoārdīšanās sasniegšanas.

Potenciāla bionoārdīšanās spēja: tādu ķīmisko vielu klasifikācija, par kurām jebkādā bionoārdīšanās testā ir iegūtas neapšaubāmas liecības par to (primārās vai galīgās) bionoārdīšanās spēju.

Pilnīga aeroba bionoārdīšanās: noārdīšanās līmenis, kas tiek sasniegts, kad testējamo ķīmisko vielu pilnībā izmanto mikroorganismi, rezultātā izdalot oglekļa dioksīdu, ūdeni, minerālsāļus un jaunas mikroorganismu šūnu sastāvdaļas (biomasu).

Mineralizācija: organisko ķīmisko vielu pilnīga noārdīšana līdz CO_2 un H_2O aerobos apstākļos un līdz CH_4, CO_2 un H_2O anaerobos apstākļos.

Kavējuma fāze: laiks no testēšanas sākuma, līdz ir sasniegta noārdošo mikroorganismu aklimatizācija un/vai adaptācija un līdz testējamās ķīmiskās vielas vai organiskās vielas bionoārdīšanās pakāpe ir paaugstinājusies līdz nosakāmam līmenim (piemēram, 10 % no maksimālās teorētiskās bionoārdīšanās vai mazāk atkarībā no mērīšanas paņēmiena precizitātes).

Noārdīšanās fāze: laiks no kavējuma perioda beigām līdz laikam, kad tiek sasniegti 90 % no noārdīšanās maksimālā līmeņa.

Plato fāze: fāze, kurā ir sasniegta maksimālā noārdīšanās un bionoārdīšanās līkne ir izlīdzinājusies.

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

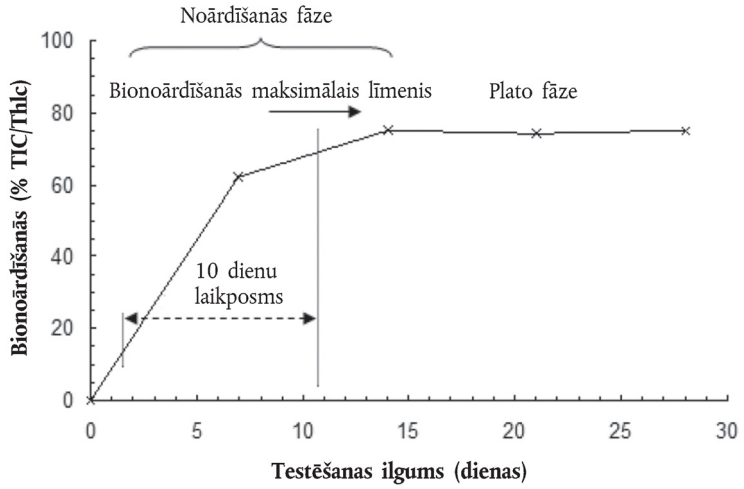
▼M4

2. papildinājums

Bionoārdīšanās līknes piemērs

1. attēls

1-oktanola bionoārdīšanās CO_2 brīvā tilpuma testā



Glosārijs

Bionoārdīšanās:

Noārdīšanās fāze:

Bionoārdīšanās maksimālais līmenis:

Plato fāze:

10 dienu laikposms:

Testēšanas ilgums (dienas):

▼M4

C.30. **BIOAKUMULĀCIJA SAUSZEMES MAZSARTĀRPOS (*OLIGOCHAETA*)**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – *TG*) 317 (2010. gads). Starp citām testēšanas metodēm, kas attiecas uz sadalīšanos vidē, 1996. gadā publicēja "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm" (šā pielikuma C.13. nodaļa (49)), savukārt 2008. gadā publicēja "Bioakumulācija nosēdumos dzīvojošajos bentiskajos mazsartārpos (*Oligochaetes*)" (53). Ir grūti un reizēm neiespējami ekstrapolēt ūdens bioakumulācijas datus attiecībā uz sauszemes organismiem, piemēram, sliekām. Pašlaik izmanto aprēķinu modeļus, kuru pamatā ir testējamās ķīmiskās vielas lipofilitāte, piemēram, atsauce (14) un (37), lai novērtētu ķīmisko vielu bioakumulāciju augsnē, piemēram, ES tehniskās pamatnostādnes (19). Nepieciešamība pēc konkrētajai jomai piemērotas testēšanas metodes jau ir risināta, piemēram, atsaucē (55). Šāda metode ir sevišķi svarīga, lai sauszemes pārtikas ķēdēs novērtētu sekundāro saindēšanos (4). Vairākās valsts līmeņa testēšanas metodēs bija pievērsta uzmanība bioakumulācijas jautājumam organismos, kas nav zivis, piemēram, atsauce (2) un (72). Amerikas Testēšanas un materiālu biedrība (turpmāk – *ASTM*) ir izstrādājusi metodi piesārņotas augsnes izraisītas bioakumulācijas mērīšanai sliekās (*Eisenia fetida*, *Savigny*) un baltajos tārpos (3). Starptautiski pieņemta metode bioakumulācijas noteikšanai piesātinātā augsnē uzlabos ķīmisko vielu riska novērtējumu sauszemes ekosistēmās, piemēram, atsauce (25) un (29).

2. Augsni uzņemoši bezmugurkaulnieki ir pakļauti ar augsni saistīto ķīmisko vielu iedarbībai. Starp šiem dzīvniekiem būtiska nozīme augšņu struktūrā un funkcionēšanā ir sauszemes mazsartārpiem (*oligochaeta*) (15) (20). Sauszemes mazsartārpi dzīvo augsnē un daļēji augsnes virskārtā (it sevišķi zemsegā). Tie nereti ir vispārstāvētākās sugas biomasas izteiksmē (54). Tā kā šie dzīvnieki nodrošina augsnes bioturbāciju un ir citu dzīvnieku barība, tiem var būt spēcīga ietekme uz ķīmisko vielu bioloģisko pieejamību citiem organismiem, piemēram, plēsīgiem bezmugurkaulniekiem (piemēram, plēsīgām ērcēm un vabolēm (64)) vai mugurkaulniekiem (piemēram, lapsām un kaijām (18) (62)). Dažas no zemes mazsartārpu sugām, ko pašlaik izmanto ekotoksikoloģijas testos, ir aprakstītas 5. papildinājumā.

3. *ASTM* sagatavotajā *Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus* (3) ir sniegti daudzi būtiski un lietderīgi dati par šīs augsnes bioakumulācijas testēšanas metodes īstenošanu. Tāpat šajā testēšanas metodē atsaucas uz tādiem dokumentiem kā šā pielikuma C.13. nodaļa "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm" (49) un ESAO *TG 315* "Bioakumulācija nosēdumos dzīvojošajos bentiskajos mazsartārpos (*Oligochaetes*)" (53). Turklāt šajā testēšanas metodē būtisku informāciju ir nodrošinājusi praktiskā pieredze, kas iegūta un aprakstīta augsnes bioakumulācijas pētījumos un publikācijās literatūrā, piemēram, atsauce (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) un (79).

4. Šī testēšanas metode ir galvenokārt piemērojama stabilām, neitrālām organiskajām ķīmiskajām vielām, kam ir tendence adsorbēties uz augsnēm. Tāpat ar šo testēšanas metodi var būt iespējams testēt bioakumulāciju ar augsni saistītos stabilos metālorganiskos savienojumos. Turklāt tā ir piemērojama metāliem un citiem mikroelementiem.

PRIEKŠNOTEIKUMS

5. Testi ķīmiskās vielas bioakumulācijas noteikšanai sauszemes mazsartārpos ir veikti ar smagajiem metāliem (sk., piemēram, atsauci (63)) un noturīgām organiskajām ķīmiskajām vielām, kuru log K_{ow} vērtības ir 3–6 diapazonā, piemēram, atsauce (40). Šādus testus piemēro:

— ķīmiskajām vielām, kuru log K_{ow} ir virs 6 (ļoti hidrofobas ķīmiskās vielas),

▼M4

— ķīmiskajām vielām, kas ietilpst tādu organisko ķīmisko vielu kategorijā, par kurām ir zināms, ka tās spēj bioakumulēties dzīvos organismos, piemēram, virsmaktīvas ķīmiskās vielas vai ķīmiskās vielas ar augstu adsorbcijas spēju,

— ķīmiskajām vielām, kuru struktūras iezīmes liecina par bioakumulācijas spēju, piemēram, tādu ķīmisko vielu analogi, kam ir zināma bioakumulācijas spēja,

— metāliem.

6. Pirms sāk pētījumu, par testējamo ķīmisko vielu ir jāiegūst tāda informācija kā vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums (vēlams, *IUPAC* nosaukums), struktūrformula, *CAS* reģistrācijas numurs, tīrība, drošības pasākumi, atbilstīgi glabāšanas apstākļi un analītiskās metodes. Turklāt jābūt zināmai šādai informācijai:

a) šķīdība ūdenī;

b) oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow});

c) augsnes un ūdens sadalīšanās koeficients, kas izteikts kā K_{oc};

d) tvaika spiediens;

e) noārdīšanās spēja (piemēram, augsnē, ūdenī);

f) zināmjie metabolīti.

7. Var izmantot radioaktīvi marķētas un nemarķētas testējamās ķīmiskās vielas. Tomēr, lai būtu vieglāk veikt analīzi, ir ieteicams izmantot radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu. Lēmumu pieņem, pamatojoties uz noteikšanas robežām vai prasību noteikt testējamo ķīmisko pamatvielu un metabolītus. Ja izmanto radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu un ja tiek noteiktas kopējās radioaktīvās atliekas, ir svarīgi radioaktīvi marķētās atliekas gan augsnē, gan testēšanas organismos raksturot, nosakot testējamās ķīmiskās pamatvielas un marķētās vielas, kas nav pamatviela, īpatsvarus, piemēram, paraugos, kuri paņemti stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās, lai būtu iespējams aprēķināt bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – *BAF*) testējamai ķīmiskajai pamatvielai un attiecīgajiem augsnes metabolītiem (sk. 50. punktu). Var nākties grozīt šeit aprakstīto metodi, piemēram, nodrošināt pietiekamu biomasu, lai noteiktu radioaktīvi nemarķētu organisku testējamo ķīmisko vielu vai metālus. Ja nosaka kopējās radioaktīvās atliekas (ar šķidrumu scintilācijas skaitīšanu pēc ekstrakcijas, dedzināšanas vai audu solubilizēšanas), bioakumulācijas koeficienta pamatā ir testējamā ķīmiskā pamatviela un metabolīti. *BAF* aprēķinu ieteicams pamatot uz testējamās ķīmiskās pamatvielas koncentrāciju organismos un uz kopējām radioaktīvajām atliekām. Pēc tam no *BAF* ir jāaprēķina biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (turpmāk – *BSAF*), kas normalizēts attiecībā uz augsnes tārpu tauku saturu un organiskā oglekļa saturu, lai nodrošinātu salīdzināmību starp dažādu bioakumulācijas testu rezultātiem.

8. Jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas toksicitātei sugām, ko izmanto testēšanā, piemēram, ietekmes koncentrācijai (EC_x) vai letālai koncentrācijai (LCx) uzņemšanas fāzes laikā (piemēram, atsauce (19)). Testējamās ķīmiskās vielas izraudzītajai koncentrācijai vēlams būt aptuveni 1 % apmērā no tās akūtās asimptotiskās LC_{50} un vismaz 10 reizes augstākai par tās noteikšanas robežu augsnē ar izmantoto analītisko metodi. Ja pieejamas, jāizvēlas toksicitātes vērtības, kas iegūtas ilgtermiņa pētījumos par subletāliem mērķparametriem (51) (52). Ja šādi dati nav pieejami, akūtās toksicitātes testēšana nodrošinās lietderīgu informāciju (sk., piemēram, atsauci (23)).

▼M4

9. Jābūt pieejamai atbilstīgai analītiskajai metodei ar zināmu precizitāti, pareizību un jutīgumu, lai varētu kvantificēt ķīmisko vielu testēšanas šķīdumos, augsnē un bioloģiskajā materiālā, kā arī jābūt pieejamiem datiem par paraugu sagatavošanu un glabāšanu un materiālu drošības datu lapām. Jābūt zināmām arī testējamās vielas analītiskās noteikšanas robežām augsnē un tārpu audos. Ja izmanto ar 14C marķētu testējamo ķīmisko vielu, jābūt zināmai īpatnējai radioaktivitātei (t. i., Bq mol-1) un ar piemaisījumiem saistītās radioaktivitātes īpatsvaram. Testējamās ķīmiskās vielas īpatnējai radioaktivitātei jābūt pietiekami augstai, lai atvieglotu analīzi, un izmantotās testēšanas koncentrācijas nedrīkstētu izsaukt toksisku ietekmi.

10. Testēšanu var veikt ar mākslīgu augsni vai ar dabīgām augsnēm. Pirms testa sākšanas jābūt zināmai informācijai par izmantotās dabīgās augsnes raksturlielumiem, tādiem kā augsnes vai tās sastāvdaļu izcelsme, pH, organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sanešu un mālu īpatsvars) un ūdens saturēšanas spēja (turpmāk – *WHC*) (3) (48).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

11. Testējamās ķīmiskās vielas bioakumulāciju raksturo tādi parametri kā bioakumulācijas koeficients (turpmāk – *BAF*), uzņemšanas ātruma konstante (k_s) un noārdīšanās ātruma konstante (k_e). Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

12. Testam ir divas fāzes, proti, uzņemšanas (ekspozīcijas) fāze un noārdīšanās (pēcekspozīcijas) fāze. Uzņemšanas fāzē tārpu atkārtojumu grupas pakļauj ar testējamo ķīmisko vielu piesātinātas augsnes iedarbībai. Papildus testēšanas dzīvniekiem identiskos apstākļos – tikai bez testējamās ķīmiskās vielas – tur kontroles tārpu grupas. Nosaka testēšanas organismu saussvaru un tauku saturu. To var paveikt, izmantojot kontroles grupas tārpus. Analītiskas pamatvērtības (tukšie testi) var iegūt, analizējot kontroles tārpu un augsnes paraugus. Noārdīšanās fāzē tārpus pārvieto uz augsni, kurā nav testējamās ķīmiskās vielas. Noārdīšanās fāze ir vajadzīga vienmēr, izņemot gadījumus, ja testējamās ķīmiskās vielas uzņemšana ekspozīcijas fāzē ir bijusi nebūtiska. Noārdīšanās fāze nodrošina informāciju par ātrumu, kādā testēšanas organismi izvada testējamo ķīmisko vielu (piemēram, atsauce (27)). Ja uzņemšanas fāzē nav sasniegts stabils stāvoklis, kinētiskos parametrus, t. i., kinētiskās bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – *BAFk*) un uzņemšanas un noārdīšanās ātruma konstanti(-es), ieteicams pamatot uz uzņemšanas un noārdīšanās fāžu rezultātu vienlaicīgu piemērošanu. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju tārpos/uz tārpiem uzrauga abās testēšanas fāzēs.

13. Uzņemšanas fāzē veic mērījumus paraugu ņemšanas laikos līdz 14 dienām (enhitreīdiem) vai 21 dienai (sliekām), līdz ir sasniegts stabils stāvoklis (11) (12) (67). Stabils stāvoklis iestājas, kad koncentrācijas tārpos grafiskais attēlojums attiecībā pret laiku ir paralēls attiecībā pret laika asi un kad trīs secīgas koncentrācijas analīzes, ko veica paraugiem, kuri ņemti vismaz divu dienu intervālos, cita no citas neatšķiras vairāk kā par ± 20 %, pamatojoties uz statistiskiem salīdzinājumiem (piemēram, mainības analīzi, regresijas analīzi).

14. Noārdīšanās fāzi veido testēšanas organismu pārvietošana uz traukiem, kas satur to pašu substrātu bez testējamās ķīmiskās vielas. Noārdīšanās fāzē mērījumus veic paraugu ņemšanas laikos 14 dienu laikā (enhitreīdiem) vai 21 dienas laikā (sliekām), ja vien agrāk veikti analītiskie mērījumi neuzrādīja testējamās ķīmiskās vielas atlieku 90 % noārdīšanos tārpos. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju tārpos noārdīšanās fāzes beigās reģistrē kā nenoārdījušās atliekas. Stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficientu (turpmāk

▼M4

– *BAFss*) vēlams aprēķināt gan kā koncentrācijas attiecību tārpos (C_a) un augsnē (C_s) šķietami stabilā stāvoklī, gan kā *BAFk* kā uzņemšanas ātruma no augsnes konstantes (k_s) un noārdīšanās ātruma konstantes (k_e) attiecību (saistībā ar definīcijām sk. 1. papildinājumu), pieņemot pirmās kārtas kinētiku (saistībā ar aprēķiniem sk. 2. papildinājumu). Ja pirmās kārtas kinētika noteikti nav piemērojama, jāizmanto citas metodes.

15. Uzņemšanas ātruma konstanti, noārdīšanās ātruma konstanti (vai konstantes, ja ir iesaistīti citi modeļi), *BAFK* un attiecīgā gadījumā katra minētā parametra ticamības robežas aprēķina no datorizētiem vienādojumu modeļiem (norādēm sk. 2. papildinājumu). Katra modeļa piemērotību var noteikt, piemēram, no korelācijas koeficienta vai noteikšanas koeficienta (koeficienti, kuru vērtība ir tuvu 1, ir labi piemēroti), vai *Hī* kvadrāta koeficienta. Tāpat standarta kļūdas vai ticamības robežas apmērs saistībā ar aplēstajiem parametriem var norādīt uz modeļa piemērotību.

16. Lai samazinātu tādu testēšanas rezultātu mainību, kas veikti ar testējamām ķīmiskajām vielām ar augstu lipofilitāti, bioakumulācijas koeficienti ir jāizsaka saistībā ar tauku saturu un organiskā oglekļa saturu (kg augsnes organiskā oglekļa uz kg tārpu tauku satura). Šīs pieejas pamatā ir tas, ka dažās ķīmisko vielu kategorijās pastāv skaidras attiecības starp bioakumulācijas spēju un lipofilitāti. Tas ir noteikts attiecībā uz zivīm (47). Pastāv attiecības starp zivju tauku saturu un šādu ķīmisko vielu bioakumulāciju. Arī attiecībā uz bentiskajiem organismiem ir atklātas līdzīgas korelācijas, piemēram, atsauce (30) un (44). Tāpat šāda korelācija ir pierādīta attiecībā uz sauszemes mazsartārpiem, piemēram, atsauce (5) (6) (7) un (14). Ja ir pieejams pietiekams daudzums tārpu audu, testēšanas dzīvnieku tauku saturu var noteikt tādā pašā bioloģiskajā materiālā, kādu izmantoja, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju. Lai noteiktu tauku saturu, var arī izmantot kontroles dzīvniekus.

TESTA DERĪGUMS

17. Lai tests būtu derīgs, gan kontroles, gan testēšanas grupām jānodrošina atbilstība šādiem kritērijiem:

— testēšanas beigās kopējā mirstība uzņemšanas un noārdīšanās fāzē nedrīkstētu pārsniegt 10 % (sliekām) vai 20 % (enhitreīdiem) no kopējā izmantoto tārpu skaita,

— *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* gadījumā vidējais masas zudums, ko nosaka uzņemšanas fāzes beigās un noārdīšanās fāzes beigās, nedrīkstētu pārsniegt 20 % salīdzinājumā ar sākotnējo svaigo svaru katras fāzes sākumā.

METODES APRAKSTS

Testēšanas sugas

18. Bioakumulācijas testēšanai ir ieteicamas vairākas sauszemes mazsartārpu sugas. Visbiežāk izmantotās sugas, proti, *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* un *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*), ir aprakstītas 5. papildinājumā.

▼M4

Iekārta

19. Jāpievērš vērība tam, lai visās iekārtas daļās izvairītos izmantot materiālus, kas varētu izšķīdināt vai adsorbēt testējamo ķīmisko vielu vai ekstrahēt citas ķīmiskās vielas un kam varētu būt negatīva ietekme uz testēšanas dzīvniekiem. Var izmantot no ķīmiski inerta materiāla izgatavotus un noslodzei, t. i., testēšanas tārpu skaitam, piemērotas ietilpības standarta taisnstūra formas vai cilindriskus traukus. Aprīkojumam, kas nonāks saskarē ar testēšanas barotni, var izmantot nerūsošo tēraudu, plastmasu vai stiklu. Testēšanas trauki ir atbilstīgi jāapsedz, lai novērstu tārpu izbēgšanu, bet vienlaikus nodrošinātu pietiekamu gaisa padevi. Ķīmiskajām vielām ar augstiem absorbcijas koeficientiem, piemēram, sintētiskajiem piretroīdiem, var būt vajadzīgs kvarca stikls. Tādos gadījumos aprīkojums pēc izmantošanas jāizmet (49). Jānovērš radioaktīvi marķētu testējamo vielu un gaistošu ķīmisko vielu iztvaikošana. Jāizmanto uztvērēji (piemēram, stikla gāzes mazgāšanas pudeles), kas satur piemērotus absorbentus, lai paturētu jebkādas atliekas, kuras iztvaiko no testēšanas traukiem.

Augsne

20. Testēšanas augsnes kvalitātei ir jānodrošina testēšanas organismu izdzīvošana un, vēlams, vairošanās aklimatizācijas un testēšanas periodos, šiem organismiem neuzrādot nekādas izskata vai darbības anomālijas. Tārpiem ir jāierokas augsnē.

21. Par substrātu testēšanā ir ieteicams izmantot mākslīgo augsni, kas aprakstīta šā pielikuma C.8. nodaļā (48). Bioakumulācijas testēšanā izmantojamās mākslīgās augsnes sagatavošanas un glabāšanas ieteikumi ir sniegti 4. papildinājumā. Ar gaisu izžāvētu mākslīgo augsni līdz izmantošanai var uzglabāt istabas temperatūrā.

22. Tomēr arī dabīgas augsnes no nepiesārņotām vietām var izmantot kā testēšanas un/vai kultivēšanas augsni. Dabīgām augsnēm ir jānorāda vismaz izcelsme (savākšanas vieta), pH, organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sanešu un mālu īpatsvars), maksimālā ūdens aiztures spēja (turpmāk – WHC_{max}) un mitruma saturs (3). Lietderīgu informāciju nodrošinās augsnes vai tās sastāvdaļu analīze pirms izmantošanas, lai noteiktu mikropiesārņotājus. Ja izmanto lauka augsni no lauku saimniecības, tā vismaz vienu gadu pirms parauga ņemšanas nedrīkst būt apstrādāta ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem vai ar tādu dzīvnieku mēslu mēslojumu, kuri ir saņēmuši kādus līdzekļus, un vismaz sešus mēnešus pirms parauga ņemšanas – ar organisku mēslojumu (50). Manipulācijas procedūras attiecībā uz dabīgām augsnēm pirms izmantošanas ekotoksikoloģijas testos ar mazsartārpiem laboratorijās ir aprakstītas (3) atsaucē. Dabīgas augsnes laboratorijā jāuzglabā pēc iespējas īsāku laiku.

Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

23. Testējamo ķīmisko vielu iejauc augsnē. Jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas fizikālās un ķīmiskās īpašības. Ūdenī šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas ir pilnībā jāizšķīdina ūdenī pirms samaisīšanas ar augsni. Ieteicamā piesātināšanas procedūra ūdenī mazšķīstošu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ietver vienas vai vairāku (mākslīgās) augsnes sastāvdaļu pārklāšanu ar testējamo ķīmisko vielu. Piemēram, kvarca smiltis vai to daļu var izmērcēt testējamās ķīmiskās vielas un piemērota organiskā šķīdinātāja šķīdumā, kas pēc tam lēnām iztvaiko līdz sausam stāvoklim. Pēc tam pārklāto daļu var

▼M4

iemaisīt mitrā augsnē. Šīs procedūras lielākā priekšrocība ir tā, ka augsnē netiek iemaisīts šķīdinātājs. Ja izmanto dabīgu augsni, testējamo ķīmisko vielu var pievienot, piesātinot daļu testēšanas augsnes, kas izžāvēta ar gaisu, kā aprakstīts iepriekš attiecībā uz mākslīgo augsni, vai iemaisot testējamo ķīmisko vielu mitrā augsnē un pēc tam nodrošinot iztvaikošanu, ja izmanto šķīdinātāju vielu. Kopumā ir pēc iespējas jāizvairās no mitras augsnes saskaršanās ar šķīdinātājiem. Jāņem vērā šādi nosacījumi (3):

— ja izmanto šķīdinātāju, kas nav ūdens, tam jābūt ar ūdeni sajaucamam šķīdinātājam un/vai tādam, kuru var attīrīt (piemēram, iztvaicējot), augsnē atstājot tikai testējamo ķīmisko vielu,

— ja izmanto šķīdinātāja kontroli, nav vajadzīga negatīva kontrole; šķīdinātāja kontrolē ir jāietver šķīdinātāja augstākā koncentrācija, kas pievienota augsnei, un jāizmanto šķīdinātājs no tās pašas sērijas, kuru izmantoja rezerves šķīduma sagatavošanai; šķīdinātāja toksicitātei un gaistamībai, kā arī testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai izraudzītajā šķīdinātājā jābūt galvenajiem kritērijiem, ko piemēro, izvēloties piemērotu šķīdinātāju vielu.

24. Ķīmiskajām vielām, kas ir ūdenī un organiskajos šķīdinātājos mazšķīstošas, 2,0–2,5 g smalku kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku var samaisīt ar testējamās ķīmiskās vielas daudzumu, piemēram, izmantojot miezeri vai piestu, lai iegūtu vēlamo testēšanas koncentrāciju. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstīgu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu vajadzīgo mitruma saturu. Galīgo maisījumu sadala pa testēšanas traukiem. Procedūru atkārto katrai testēšanas koncentrācijai, kā arī sagatavo atbilstīgu kontroles trauku ar 2,0–2,5 g smalku kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku.

25. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē pēc piesātināšanas. Pirms testēšanas organismu ielaišanas ir jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas homogēns sadalījums augsnē. Pārskatā jānorāda piesātināšanas metode un konkrētas piesātināšanas procedūras izvēles pamatojums (24).

26. Pirms ielaiž organismus, vēlams ļaut iestāties līdzsvaram starp augsni un porūdens fāzi. Ieteicamais laikposms ir četras dienas 20 °C temperatūrā. Daudzu ūdenī mazšķīstošu organisko ķīmisko vielu gadījumā laiks, kas vajadzīgs, lai sasniegtu patiesu līdzsvaru starp adsorbētajām un izšķīdušajām daļām, var būt vairākas dienas vai mēneši. Atkarībā no pētījuma mērķa, piemēram, kad ir jāimitē vides apstākļi, piesātināto augsni var "briedināt" ilgāku laikposmu, piemēram, metālu gadījumā tās būtu trīs nedēļas 20 °C temperatūrā (22).

Testēšanas organismu kultivēšana

27. Tārpus vēlams turēt pastāvīgā laboratorijas kultūrā. Norādījumi par laboratorijas kultivēšanas metodēm attiecībā uz *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei*, kā arī enhitreīdu sugām ir sniegti 5. papildinājumā (sk. arī atsauci (48) (51) un (52)).

28. Testēšanā izmantotajiem tārpiem nedrīkst būt pamanāmu slimību, anomāliju un parazītu.

TESTĒŠANAS NORISE

29. Testēšanas organismus uzņemšanas fāzē pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Uzņemšanas fāzei jāilgst 14 dienas (enhitreīdiem) vai 21 dienu (sliekām), ja vien nav pierādīts, ka ir sasniegts stabils stāvoklis.

▼M4

30. Noārdīšanās fāzē tārpus pārvieto uz augsni, kurā nav testējamās ķīmiskās vielas. Pirmais paraugs jāņem 4–24 stundu laikā pēc noārdīšanās fāzes sākšanās. Paraugu ņemšanas grafiku piemēri 21 dienas uzņemšanas fāzei un 21 dienas noārdīšanās fāzei ir sniegti 3. papildinājumā.

Testēšanas organismi

31. Daudzām sauszemes enhitreīdu sugām atsevišķu īpatņu svars ir ļoti mazs (piemēram, 5–10 mg mitrais svars katram *Enchytraeus albidus* īpatnim un vēl mazāk *Enchytraeus crypticus* vai *Enchytraeus luxuriosus* īpatņiem). Lai noteiktu svaru un veiktu ķīmisko analīzi, var būt nepieciešams apvienot atkārtojuma testēšanas trauku tārpus (t. i., visus atkārtojuma trauka tārpus izmanto, lai iegūtu vienu analītisku audu rezultātu). Katram atkārtojumam pievieno 20 enhitreīdu īpatņus, un jāizmanto vismaz trīs atkārtojumi. Ja testējamās ķīmiskās vielas analītiskās noteikšanas robeža ir augsta, var būt vajadzīgs vairāk tārpu. Testēšanas sugām ar lielāku īpatņu svaru (*Eisenia fetida* un *Eisenia andrei*) var izmantot atkārtojuma traukus, kas satur vienu īpatni.

32. Testēšanā izmantotajām sliekām jābūt līdzīgam svaram (piemēram, *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* atsevišķu īpatņu svaram jābūt 250–600 mg). Enhitreīdu (piemēram, *Enchytraeus albidus*) garumam jābūt aptuveni 1 cm. Visiem konkrētā testā izmantotajiem tārpiem jābūt no viena avota un pieaugušiem dzīvniekiem ar jostiņu (sk. 5. papildinājumu). Tā kā dzīvnieka svars un vecums var ietekmēt *BAF* vērtības (piemēram, tauku satura un/vai oliņu dēļ), šie parametri ir precīzi jāreģistrē un jāņem vērā, interpretējot rezultātus. Turklāt ekspozīcijas laikā var atbrīvoties no kokoniem, kas arī ietekmēs *BAF* vērtības. Pirms testēšanas ieteicams nosvērt testēšanas tārpu apakšparaugu, lai noteiktu vidējo mitro svaru un saussvaru.

33. Jāizmanto augsta augsnes un tārpu attiecība, lai pēc iespējas samazinātu testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas samazināšanos augsnē uzņemšanas fāzē. Katrā testēšanas traukā *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* gadījumā ieteicamais minimālais daudzums ir 50 g saussvara augsnes uz tārpu, savukārt enhitreīdu gadījumā ieteicamais minimālais daudzums ir 10–20 g saussvara augsnes uz tārpu. Traukiem jāsatur 2–3 cm (enhitreīdiem) vai 4–5 cm (sliekām) dziļš augsnes slānis.

34. Testēšanā izmantotos tārpus izņem no kultūras (piemēram, enhitreīdus izņem ar juveliera pinceti). Pieaugušos dzīvniekus pārvieto uz neapstrādātu testēšanas augsni aklimatizācijai un baro (sk. 36. punktu). Ja testēšanas apstākļi atšķiras no kultūras apstākļiem, tārpu adaptācijai testēšanas apstākļiem jāpietiek ar 24–72 h aklimatizācijas fāzi. Pēc aklimatizācijas sliekas noskalo, tās ievietojot stikla traukos (piemēram, Petri traukos) ar tīru ūdeni, un nosver pirms ielaišanas testēšanas augsnē. Pirms nosvēršanas ir jāatbrīvojas no liekā ūdens uz tārpiem, tos uzmanīgi piespiežot pie trauka malas vai nosusinot ar nedaudz samitrinātu papīra dvieli.

35. Jānovēro un jāreģistrē testēšanas organismu ierakšanās tendences augsnē. Testos ar sliekām (kontroles un apstrādes grupu) dzīvnieki parasti ierokas augsnē dažu stundu laikā. Tas ir jāpārbauda ne vēlāk kā pēc 24 h pēc tārpu ielaišanas testēšanas traukos. Ja sliekas neierokas augsnē (piemēram, pāri 10 % vairāk nekā pusē no uzņemšanas fāzes laika), tas norāda, ka vai nu testēšanas apstākļi nav piemēroti, vai testēšanas organismi nav veselīgi. Tādā

▼M4

gadījumā testēšana jāpārtrauc un jāatkārto. Enhitreīdi galvenokārt dzīvo augsnes starpporās, un nereti to ārējais apvalks var tikai daļēji saskarties ar apkārtējo substrātu. Ierakušos un neierakušos enhitreīdu ekspozīciju pieņem par vienlīdzīgu, un enhitreīdu neierakšanās ne vienmēr nozīmē, ka tests ir jāatkārto.

Barošana

36. Barošana ir jāparedz gadījumā, ja izmanto augsni ar zemu kopējo organiskā oglekļa saturu. Ja izmanto mākslīgu augsni, ir ieteicama nedēļas barošana (t. i., tārpi jābaro reizi nedēļā) 7 mg sausu mēslu uz gramu sausas augsnes apmērā sliekām un nedēļas barošana 2–2,5 mg maltu auzu pārslu uz gramu sausas augsnes apmērā enhitreīdiem (11). Pirmā barības deva ir jāsamaisa ar augsni tieši pirms testēšanas organismu ielaišanas. Vēlams izmantot tādu pašu barības veidu, kādu izmantoja kultivēšanā (sk. 5. papildinājumu).

Gaisma un temperatūra

37. Testēšana jāveic kontrolēta apgaismojuma ciklā ar 16/8 stundu gaismas (vēlams, 400–800 luksi)/tumsas ciklu testēšanas trauku telpā (3). Testēšanas temperatūrai jābūt 20 ± 2 °C visā testēšanas laikā.

Testēšanas koncentrācijas

38. Izmanto vienu koncentrāciju. Ja vajadzīgas papildu koncentrācijas, tas ir jāpamato. Ja testējamās ķīmiskās vielas toksicitāte (EC_x) ir tuvu analītiskās noteikšanas robežai, ieteicams izmantot radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu ar augstu īpatnējo radioaktivitāti. Metālu gadījumā koncentrācijai jābūt virs pamatlīmeņa audos un augsnē.

Atkārtojumi

39. Kinētikas mērījumiem (uzņemšanas un noārdīšanās fāze) apstrādāto atkārtojuma trauku minimālajam skaitam jābūt trijiem uz katru paraugu ņemšanas punktu. Kopējam sagatavoto atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu visas paraugu ņemšanas reizes uzņemšanas un noārdīšanās fāzē.

40. Bioloģiskajiem novērojumiem un mērījumiem (piemēram, saussvara un mitrā svara attiecība, tauku saturs) un pamatkoncentrāciju analīzei tārpos un augsnē ir vajadzīgi vismaz 12 negatīvas kontroles atkārtojumu trauki (četrus paraugus ņem sākumā, četrus – uzņemšanas beigās un četrus – noārdīšanās beigās), ja neizmanto šķīdinātāju (izņemot ūdeni). Ja testējamās ķīmiskās vielas pievienošanai izmanto kādu šķīdinātāju vielu, papildus apstrādātajiem atkārtojumiem jānodrošina šķīdinātāja kontrole (četriem atkārtojumu traukiem jāņem paraugi sākumā, četriem – uzņemšanas fāzes beigās un četriem – noārdīšanās fāzes beigās), kas ietver visas sastāvdaļas, izņemot testējamo vielu. Tādā gadījumā var nodrošināt arī četrus papildu negatīvas kontroles atkārtojumu traukus (bez šķīdinātāja), lai ņemtu fakultatīvus paraugus uzņemšanas fāzes beigās. Šos atkārtojumus var bioloģiski salīdzināt ar šķīdinātāja kontroles trauku, lai iegūtu informāciju par šķīdinātāja iespējamo ietekmi uz testēšanas organismiem. Ieteicams noteikt, kāds būtu papildu rezerves atkārtojumu trauku pietiekams skaits (piemēram, astoņi) apstrādei un kontrolei.

▼M4

Augsnes kvalitātes mērījumu regularitāte

41. Augsnes pH, augsnes mitruma saturs un temperatūra (nepārtraukti) testēšanas telpā ir jānosaka uzņemšanas un noārdīšanās fāžu sākumā un beigās. Augsnes mitruma saturs ir jākontrolē reizi nedēļā, nosverot testēšanas traukus un salīdzinot faktisko svaru ar sākotnējo svaru testēšanas sākumā. Ūdens zudumi ir jākompensē, pievienojot dejonizētu ūdeni.

Tārpu un augsnes paraugu ņemšana un analīze

42. Slieku un enhitreīdu bioakumulācijas testa uzņemšanas un noārdīšanas fāžu grafika piemērs ir sniegts 3. papildinājumā.

43. Testēšanas trauku augsnes paraugus ņem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju pirms tārpu ielaišanas, kā arī uzņemšanas un noārdīšanas fāžu laikā. Testēšanas laikā nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas tārpos un augsnē. Parasti nosaka kopējās koncentrācijas augsnē. Var noteikt arī koncentrācijas porūdenī. Tādā gadījumā, pirms sāk pētījumu, jāsniedz pamatojums un paredzētās attiecīgās metodes, ko pēc tam iekļauj pārskatā.

44. Tārpu un augsnes paraugus ņem vismaz sešas reizes uzņemšanas un noārdīšanas fāžu laikā. Ja tiek apliecināta testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte, var samazināt augsnes analīžu skaitu. Ieteicams analizēt vismaz trīs atkārtojumus uzņemšanas fāzes sākumā un beigās. Ja uzņemšanas fāzes beigās noteiktā koncentrācija augsnē atšķiras no sākotnējās koncentrācijas vairāk nekā par 30 %, jāanalizē arī augsnes paraugi, kas ņemti citos laikos.

45. Konkrēta atkārtojuma trauka tārpi jāizņem no augsnes katrā paraugu ņemšanas reizē (piemēram, pēc atkārtojuma augsnes izklāšanas seklā traukā un tārpu izņemšanas ar neasu juveliera pinceti) un ātri jānoskalo ar ūdeni seklā stikla vai tērauda traukā. Jāatbrīvojas no liekā ūdens (sk. 34. punktu). Tārpi uzmanīgi jāpārvieto uz iepriekš nosvērtu trauku un nekavējoties jānosver kopā ar zarnu saturu.

46. Pēc tam sliekām (*Eisenia* sp.) nakts laikā jāļauj iztīrīt zarnas, piemēram, uz mitra filtrpapīra apsegtā Petri traukā (sk. 34. punktu). Pēc zarnu iztīrīšanās jānosaka tārpu svars, lai novērtētu iespējamo biomasas samazinājumu testēšanas laikā (sk. derīguma kritērijus 17. punktā). Enhitreīdus sver un audus analizē bez zarnu iztīrīšanās, jo tas ir tehniski sarežģīti šo tārpu mazā izmēra dēļ. Pēc galīgā svara noteikšanas tārpi ir nekavējoties jānogalina, izmantojot piemērotāko metodi (piemēram, izmantojot šķidro slāpekli vai sasaldējot temperatūrā zem –18 °C).

47. Noārdīšanās fāzē tārpi aizvieto piesārņoto zarnu saturu ar tīru augsni. Tas nozīmē, ka mērījumi tārpos, kam nav bijusi zarnu iztīrīšanās (šajā gadījumā enhitreīdos) un kam ņem paraugus tieši pirms noārdīšanās fāzes, ietver piesārņoto augsni zarnās. Attiecībā uz ūdens mazsartārpiem pieņem, ka pēc noārdīšanās fāzes sākotnējām 4–24 h lielākā daļa piesārņotā zarnu satura ir aizvietota ar tīriem nosēdumiem, piemēram, atsauce (46). Līdzīgi konstatējumi ir publicēti pārskatos par pētījumiem attiecībā uz radioaktīvi marķēta kadmija un cinka akumulāciju sliekās (78). Enhitreīdiem, kam nav bijusi zarnu iztīrīšanās, šā pirmā noārdīšanās fāzes parauga koncentrāciju var uzskatīt par koncentrāciju audos pēc zarnu iztīrīšanās. Lai ņemtu vērā testējamās vielas koncentrācijas atšķaidīšanos ar nepiesārņotu augsni noārdīšanās fāzes laikā, zarnu satura svaru var aplēst pēc tārpu mitrā svara / tārpu pelnu svara vai tārpu saussvara / tārpu pelnu svara attiecības.

▼M4

48. Augsnes un tārpu paraugus ir ieteicams analizēt tūlīt pēc paņemšanas (t. i., 1–2 dienu laikā), lai novērstu degradāciju vai citus zudumus, un ir ieteicams aprēķināt aptuveno uzņemšanas un noārdīšanās ātrumu testēšanas turpinājumā. Ja analīzi veic vēlāk, paraugi jāuzglabā saskaņā ar piemērotu metodi, piemēram, saldēti (≤ –18 °C).

49. Jāpārbauda, vai ķīmiskās analīzes precizitāte un atkārtojamība, kā arī testējamās ķīmiskās vielas atguve no augsnes un tārpu paraugiem ir pietiekamas konkrētajai metodei. Pārskatā jānorāda ekstrahēšanas efektivitāte, noteikšanas robeža (turpmāk – *LOD*) un kvantificēšanas robeža (turpmāk – *LOQ*). Tāpat ir jāpārbauda, vai testējamā ķīmiskā viela kontroles traukos nav nosakāma koncentrācijās, kas pārsniedz pamatkoncentrācijas. Ja testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā (C_a) kontroles tārpos ir > 0, tas jāietver kinētisko parametru aprēķinā (sk. 2. papildinājumu). Ar visiem paraugiem testēšanas laikā jārīkojas tā, lai pēc iespējas mazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, testējamās ķīmiskās vielas adsorbcijas dēļ uz paraugu iekārtas).

50. Strādājot ar radioaktīvi marķētām vielām, ir iespējams analizēt pamatvielas un metabolītus. Testējamās ķīmiskās pamatvielas un metabolītu kvantificēšana stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās nodrošina svarīgu informāciju. Pēc tam paraugi ir "jāiztīra", lai varētu atsevišķi kvantificēt testējamo ķīmisko pamatvielu. Ja atsevišķi metabolīti pārsniedz 10 % no kopējās radioaktivitātes analizētajā(-os) paraugā(-os), ieteicams identificēt šos metabolītus.

51. Jāreģistrē un pārskatā jānorāda kopējā atguve un testējamās ķīmiskās vielas atguve tārpos, augsnē un, ja izmantoti, uztvērējos ar absorbentiem, lai paturētu iztvaikoto testējamo ķīmisko vielu.

52. Attiecībā uz enhitreīdiem ir pieļaujami apvienot īpatņu paraugus no konkrēta testēšanas trauka, jo šie tārpi ir mazāki par sliekām. Ja apvienošana nozīmē atkārtojumu skaita samazināšanu, tas ierobežo statistiskās procedūras, ko var piemērot datiem. Ja ir vajadzīga konkrēta statistikā procedūra un nozīmīgums, testēšanā jāietver pietiekams skaits atkārtojumu testēšanas trauku, lai nodrošinātu vēlamo apvienošanu, procedūru un nozīmīgumu.

53. *BAF* ieteicams izteikt gan kā kopējā saussvara funkciju, gan, kad vajadzīgs (t. i., ļoti hidrofobām ķīmiskajām vielām), kā tauku satura funkciju. Tauku satura noteikšanai jāizmanto piemērotas metodes (šim nolūkam jāpielāgo dažas no esošajām metodēm, piemēram, atsauce (31) un (58)). Šajās metodēs izmanto hloroforma/metilspirta ekstrakcijas paņēmienu. Tomēr, lai izvairītos no hloru saturošu šķīdinātāju izmantošanas, jāizmanto pielāgota *Bligh* un *Dyer* metode (9), kā aprakstīts atsaucē (17). Tā kā dažādas metodes var nenodrošināt identiskas vērtības, ir svarīgi sniegt sīku informāciju par izmantoto metodi. Kad iespējams, t. i., ja ir pieejami pietiekami tārpu audi, tauku analīzi vēlams veikt tam pašam paraugam vai ekstraktam, ko izmantoja testējamās ķīmiskās vielas analīzei, jo tauki nereti ir jānoņem no ekstrakta, pirms to var analizēt hromatogrāfiski (49). Var arī izmantot kontroles dzīvniekus, lai noteiktu tauku saturu, ko pēc tam var izmantot, lai normalizētu *BAF* vērtības. Šī pēdējā minētā pieeja samazina aprīkojuma piesārņošanu ar testējamo ķīmisko vielu.

▼M4

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

54. Testējamās ķīmiskās vielas uzņemšanas līkni iegūst, grafiski attēlojot tās koncentrāciju tārpos / uz tārpiem uzņemšanas fāzē attiecībā pret laiku aritmētiskā skalā. Kad līkne ir sasniegusi plato vai stabilu stāvokli (sk. definīcijas 1. papildinājumā), stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – *BAFss*) aprēķina šādi:

$$\frac{C_a \text{ stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās (vidējais)}}{C_s \text{ stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās (vidējais)}}$$

C_a ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā.

C_s ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē.

55. Ja stabils stāvoklis netiek sasniegts, *BAFss* vietā jānosaka *BAFK*, pamatojoties uz ātruma konstantēm, kā aprakstīts turpmāk:

— nosaka akumulācijas koeficientu (BAF_K) kā attiecību k_s/k_e,

— uzņemšanas un noārdīšanās ātrumus ir vēlams aprēķināt vienlaikus (sk. 2. papildinājuma 11. vienādojumu),

— noārdīšanās ātruma konstanti (k_e) parasti nosaka no noārdīšanās līknes (t. i., testējamās vielas koncentrācijas tārpos noārdīšanās fāzē grafiska attēlojuma); pēc tam aprēķina uzņemšanas ātruma konstanti (k_s), ņemot vērā k_e un C_a vērtību, ko iegūst no uzņemšanas līknes, sk. 2. papildinājumu, kur sniegts šo metožu apraksts; BAF_K un ātruma konstanšu k_s un k_e iegūšanai vēlams izmantot nelineāras parametru aprēķināšanas metodes datorā; ja noārdīšanās acīmredzami nav pirmās kārtas noārdīšanās, jāizmanto sarežģītāki modeļi.

Testēšanas pārskats

56. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

— jebkāda pieejamā informācija par testējamās ķīmiskās vielas akūtu vai ilgtermiņa toksicitāti (piemēram, EC_x, LC_x, *NOEC*) attiecībā uz augsnē dzīvojošiem mazsartārpiem,

— tīrība, fizikālās īpašības un fizikālās un ķīmiskās īpašības, piemēram, log K_{ow}, šķīdība ūdenī,

— ķīmiskās identifikācijas dati, testējamās vielas avots un ikviena izmantotā šķīdinātāja koncentrācija un identitāte,

— ja izmanto radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu, marķēto atomu precīza atrašanās vieta, īpatnējā radioaktivitāte un radioķīmiskā tīrība.

Testēšanas sugas:

— zinātniskais nosaukums, paveids, avots, jebkāda iepriekšēja apstrāde, aklimatizācija, vecums, izmēra diapazons utt.

▼M4

Testēšanas apstākļi:

— izmantotā testēšanas procedūra,

— izmantotā apgaismojuma veids un raksturlielumi, kā arī periods(-i),

— testēšanas plāns (piemēram, testēšanas trauku skaits un izmērs, augsnes masa un augsnes slāņa augstums, atkārtojumu skaits, tārpu skaits katrā atkārtojumā, testēšanas koncentrāciju skaits, uzņemšanas un noārdīšanās fāžu ilgums un paraugu ņemšanas regularitāte),

— testēšanas trauku materiāla izvēles pamatojums,

— testējamās vielas sagatavošanas un pievienošanas metode, kā arī konkrētās metodes izvēles pamatojums,

— testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie lielumi un to standartnovirzes testēšanas traukos, kā arī šo vērtību iegūšanas metode,

— mākslīgās augsnes sastāvdaļu avots vai, ja izmanto dabīgas barotnes, augsnes izcelsme, jebkādas iepriekšējas apstrādes apraksts, kontroles trauku rezultāti (izdzīvošana, biomasas attīstība, vairošanās), augsnes raksturlielumi (pH, kopējais organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sanešu un mālu īpatsvars), WHC_{max}, ūdens satura īpatsvars testēšanas sākumā un beigās, kā arī jebkādi citi veiktie mērījumi),

— sīka informācija par augsnes un tārpu paraugu apstrādi, arī par sagatavošanas, glabāšanas un piesātināšanas procedūrām, ekstrakciju un analītiskajām procedūrām (un precizitāti), ko izmantoja attiecībā uz testējamo vielu tārpos un augsnē, kā arī par tauku saturu (ja to nosaka) un testējamās vielas atguvi.

Rezultāti:

— kontroles grupu tārpu un katra testēšanas trauka tārpu mirstība, kā arī jebkāda novērotā darbības anomālija (piemēram, izvairīšanās no augsnes, nevairošanās bioakumulācijas testā ar enhitreīdiem),

— augsnes un testēšanas organismu saussvara un mitrā svara attiecība (noder normalizācijai),

— tārpu mitrais svars katrā paraugu ņemšanas reizē; sliekām – mitrais svars testēšanas sākumā un katrā paraugu ņemšanas reizē pirms un pēc zarnu iztīrīšanas,

— testēšanas organismu tauku saturs (ja to nosaka),

— līknes, kas attēlo testējamās ķīmiskās vielas uzņemšanas un noārdīšanās kinētiku tārpos un laiku, kurš vajadzīgs, lai sasniegtu stabilu stāvokli,

— C_a un C_s (ar standartnovirzi un diapazonu, ja vajadzīgs) visām paraugu ņemšanas reizēm (C_a izsaka g/kg visa ķermeņa mitrā un saussvara, C_s izsaka g/kg augsnes mitrā un saussvara); ja ir vajadzīgs biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (turpmāk – *BSAF*) (piemēram, lai salīdzinātu rezultātus no diviem vai vairākiem testiem, kas veikti ar dzīvniekiem ar dažādu tauku saturu), C_a var papildus izteikt kā g/kg^{-1} organisma tauku satura, savukārt C_s var izteikt kā g/kg^{-1} augsnes organiskā oglekļa,

— *BAF* (kas izteikts kā kg augsnes/kg^{-1} tārpu), augsnes uzņemšanas ātruma konstante k_s (izteikta kā g augsnes/kg^{-1} tārpu dienā) un noārdīšanās ātruma konstante k_e (uz dienu); papildus var norādīt *BSAF* (izteikts kā kg augsnes neorganiskā oglekļa/kg^{-1} tārpu tauku satura),

▼M4

— ja noteikti – ķīmiskās pamatvielas, metabolītu un saistītu atlieku īpatsvari (t. i., testējamās ķīmiskās vielas īpatsvars, ko nevar ekstrahēt ar parastām ekstrakcijas metodēm), kas noteikti augsnē un testēšanas dzīvniekos,

— datu statistiskajai analīzei izmantotās metodes.

Rezultātu novērtēšana:

— rezultātu atbilstība 17. punktā uzskaitītajiem derīguma kritērijiem,

— neparedzēti vai neparasti rezultāti, piemēram, testējamās ķīmiskās vielas nepilnīga noārdīšanās testēšanas dzīvniekos.

LITERATŪRA

(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 W (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķimikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (*REACH*) un ar kuru izveido Eiropas Ķimikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK (OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.).

(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 *Oligochates*, 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. lpp. Pieejams lejupielādēšanai: 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 S.

▼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 S.

(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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

(49) Šā pielikuma C.13. nodaļa "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm".

(50) Šā pielikuma C.21. nodaļa "Augsnes mikroorganismi – slāpekļa transformācijas tests".

(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 *Oligochates*, 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. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Bioakumulācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē. Bioakumulācija izriet gan no biokoncentrācijas, gan biopalielināšanās procesa (sk. turpmāk).

Biokoncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā, ko izraisa ķīmiskās vielas uzņemšana tikai no apkārtējās barotnes (t. i., caur ķermeņa virsmu un uzņemto augsni), attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē.

Biopalielināšanās ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā, ko galvenokārt izraisa piesārņotas barības vai laupījuma uzņemšana, attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju barībā vai laupījumā. Biopalielināšanās var novest pie testējamās vielas pārvietošanās vai akumulācijas barošanās tīklos.

Testējamās ķīmiskās vielas **noārdīšanās** ir šīs ķīmiskās vielas zudums no testēšanas organisma audiem, pateicoties aktīviem vai pasīviem procesiem, kas notiek neatkarīgi no testējamās vielas klātesības vai neesības apkārtējā barotnē.

Bioakumulācijas koeficients (*BAF*) šā bioakumulācijas testa jebkurā uzņemšanas fāzes laikā ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā vai uz tā (C_a g/kg^{-1} tārpu saussvara), ko dala ar testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē (C_s kā g/kg^{-1} augsnes saussvara); *BAF* vienības ir kg augsnes/kg^{-1} tārpu.

Stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficients (BAF_{ss}) ir *BAF* stabilā stāvoklī un būtiski nemainās ilgākā laikposmā, šajā laikā nemainoties testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai apkārtējā barotnē (C_s kā g/kg^{-1} augsnes saussvara).

Bioakumulācijas koeficienti, kas aprēķināti tieši no augsnes uzņemšanas ātruma konstantes un noārdīšanās ātruma konstantes (k_s un k_e, sk. turpmāk) attiecības, ir kinētiskās bioakumulācijas koeficients (BAF_K).

Biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (*BSAF*) ir testējamās ķīmiskās vielas ar taukiem normalizēta koncentrācija testēšanas organismā vai uz tā, ko dala ar testējamās ķīmiskās vielas ar organisko oglekli normalizētu koncentrāciju augsnē stabilā stāvoklī. Pēc tam C_a izsaka kā g/kg^{-1} organisma tauku satura, savukārt C_s izsaka kā g/kg^{-1} augsnes organiskā oglekļa satura; *BSAF* vienības ir kg organiskā oglekļa/kg^{-1} tauku.

Plato vai **stabils stāvoklis** ir līdzsvars starp uzņemšanas un noārdīšanās procesiem, kas notiek vienlaikus ekspozīcijas fāzē. *BAF* grafiskajā attēlojumā stabils stāvoklis pret laiku ir sasniegts tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trīs secīgas *BAF* analīzes paraugiem, kas ņemti vismaz divu dienu intervālos, savā starpā sakrīt vismaz ± 20 % robežās, un starp trijiem paraugu ņemšanas periodiem nav statistiski būtisku atšķirību. Testējamām ķīmiskajām vielām, ko uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas (49).

Organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{oc}) ir ķīmiskās vielas koncentrācijas augsnes organiskā oglekļa daļā vai uz tās un ķīmiskās vielas koncentrācijas ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī.

Oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}) ir ķīmiskās vielas šķīdības n-oktanolā un ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī, ko dažreiz izsaka arī kā P_{ow}. K_{ow} logaritmu (log K_{ow}) izmanto kā rādītāju ķīmiskās vielas bioakumulācijas spējai ūdens organismos.

▼M4

Uzņemšanas vai ekspozīcijas fāze ir laiks, kurā testēšanas organismi ir pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai.

Augsnes uzņemšanas ātruma konstante (k_s) ir skaitlisks lielums, kas apraksta testējamās vielas koncentrācijas testēšanas organismā vai uz tā palielināšanās ātrumu, ko izraisa uzņemšanas no augsnes fāze. k_s izsaka g augsnes/kg^{-1} tārpu dienā.

Noārdīšanās fāze ir laiks pēc testēšanas organismu pārvietošanas no piesārņotas barotnes uz barotni bez testējamās vielas, kura laikā pēta ķīmiskās vielas noārdīšanos (vai neto zudumu) testēšanas organismos.

Noārdīšanās ātruma konstante (k_e) ir skaitlisks lielums, kas apraksta testējamās vielas koncentrācijas testēšanas organismā vai uz tā samazināšanās ātrumu pēc testēšanas organismu pārvietošanas no barotnes, kura satur testējamo vielu, uz barotni bez ķīmiskajām vielām. k_e izsaka uz dienu (d^{-1}).

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M4

2. papildinājums

Uzņemšanas un noārdīšanās parametru aprēķināšana

Bioakumulācijas testa galvenais mērķparametrs ir bioakumulācijas koeficients (turpmāk – *BAF*). Noteikto *BAF* var aprēķināt, dalot koncentrāciju testēšanas organismā (C_a) ar koncentrāciju augsnē (C_s) stabilā stāvoklī. Ja stabilu stāvokli nesasniedz uzņemšanas fāzē, stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficienta (turpmāk – *BAFss*) vietā no ātrumu konstantēm aprēķina kinētiskās bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAF_K). Tomēr jānorāda, vai *BAF* pamatā ir koncentrācijas stabilā stāvoklī vai ne.

Parasti BAF_K, augsnes uzņemšanas ātruma konstanti (k_s) un noārdīšanās ātruma konstanti (k_e) iegūst, izmantojot nelineāras parametru aprēķināšanas metodes datorā, piemēram, pamatojoties uz modeļiem, kas aprakstīti atsaucē (68). Ja tiek ievadīts secīgu laika koncentrāciju datu kopums un vienādojumu modeļi:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(1. vienādojums)}$$

vai

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(2. vienādojums)}$$

kur:

C_a = ķīmiskās vielas koncentrācija tārpos (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

k_s = uzņemšanas ātruma konstante audos (g augsnes/kg^{-1} tārpu dienā);

C_s = ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

k_e = noārdīšanās ātruma konstante (uz dienu);

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās,

šīs datorprogrammas aprēķina BAF_K, k_s un k_e vērtības.

Ja pamatkoncentrācija iedarbībai nepakļautos tārpos, piemēram, 0. dienā, būtiski atšķiras no nulles (tā tas var būt, piemēram, metālu gadījumā), šī pamatkoncentrācija ($C_{a,0}$) ir jāietver šajos vienādojumos, proti, šādi:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(3. vienādojums)}$$

un

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(4. vienādojums)}$$

Gadījumos, kad tiek novērota testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas būtiska samazināšanās augsnē uzņemšanas fāzes laikā, var izmantot šādus modeļus, piemēram, atsauce (67) un (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{(5. vienādojums)}$$

▼M4

kur:

C_s = ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

k_0 = degradācijas ātruma konstante augsnē (uz dienu);

C_0 = ķīmiskās vielas sākotnējā koncentrācija augsnē (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(6. vienādojums)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(7. vienādojums)}$$

kur:

C_a = ķīmiskās vielas koncentrācija tārpos (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

k_s = uzņemšanas ātruma konstante audos (g augsnes/kg tārpu dienā);

k_0 = degradācijas ātruma konstante augsnē (uz dienu);

k_e = noārdīšanās ātruma konstante (uz dienu);

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās.

Ja stabils stāvoklis tiek sasniegts uzņemšanas fāzē (t. i., t = ∞), 1. vienādojumu

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(1. vienādojums)}$$

var reducēt šādi:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

vai šādi:

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(8. vienādojums)}$$

Tādā gadījumā $k_s/k_e \times C_s$ ir pieeja, kā noteikt testējamās vielas koncentrāciju tārpu audos stabilā stāvoklī ($C_{a,ss}$).

Biocenozes un augsnes akumulācijas koeficientu (turpmāk – *BSAF*) var aprēķināt šādi:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(9. vienādojums),}$$

kur f_{oc} ir augsnes organiskā oglekļa daļa un f_{lip} ir tārpu tauku daļa, ko abas ir vēlams noteikt no testēšanas laikā ņemtiem paraugiem, pamatojoties attiecīgi vai nu uz saussvaru, vai mitro svaru.

Noārdīšanās kinētiku var modelēt, izmantojot noārdīšanās fāzes datus un piemērojot turpmāk norādīto vienādojuma modeli un uz datoru pamatotu nelineārās parametru aprēķināšanas metodi. Ja datu punkti, kas grafiski attēloti attiecībā pret laiku, norāda uz testējamās vielas koncentrācijas dzīvniekos nepārtrauktu eksponenciālu samazināšanos, var izmantot viena nodalījuma modeli (9. vienādojums), lai aprakstītu noārdīšanās gaitu laikā.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(10. vienādojums)}$$

▼**M4**

Noārdīšanās procesi dažreiz, izrādās, ir divfāzu, uzrādot C_a strauju samazināšanos agrīnās fāzēs, kas pēc tam pāriet uz testējamo vielu lēnāku zudumu noārdīšanās vēlākās fāzēs, piemēram, atsauce (27) un (68). Abas fāzes var interpretēt ar pieņēmumu, ka organismā ir divi atšķirīgi nodalījumi, no kuriem testējamā viela izzūd atšķirīgos ātrumos. Šādos gadījumos jāizpēta konkrēta literatūra, piemēram, atsauce (38) (39) (40) un (78).

Izmantojot iepriekš norādītos vienādojumu modeļus, kinētikas parametrus (k_s un k_e) var aprēķināt arī vienā piegājienā, vienlaikus piemērojot pirmās kārtas kinētikas modeli visiem datiem gan no uzņemšanas, gan noārdīšanās fāzes. Saistībā ar metodi, kas ļautu apvienoti aprēķināt uzņemšanas un noārdīšanās ātruma konstantes, var atsaukties uz atsauci (41), (73) un (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{(11. vienādojums)}$$

Piezīme. Ja uzņemšanas un noārdīšanās parametrus nosaka vienlaikus ar apvienotajiem uzņemšanas un noārdīšanās datiem, "m" 11. vienādojumā ir elements, kas ļauj datorprogrammai vienādojuma apakšelementus iedalīt attiecīgās fāzes datu kopām un pareizi veikt novērtējumu (m = 1 uzņemšanas fāzei; m = 2 noārdīšanās fāzei).

Tomēr šie vienādojumu modeļi ir jāizmanto piesardzīgi, sevišķi ja testēšanas laikā mainās testējamās ķīmiskās vielas bioloģiskā pieejamība vai (bio)noārdīšanās spēja (sk., piemēram, atsauci (79).)

▼M4

3. papildinājums

AUGSNES BIOAKUMULĀCIJAS TESTU GRAFIKA PIEMĒRI

Tests ar sliekām

a) Uzņemšanas fāze ar astoņu paraugu ņemšanas datumiem, ko izmanto kinētikas aprēķiniem

Diena	Darbība
– 6	Sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes daļas piesātināšana ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu; šķīdinātāja, ja lietots, iztvaikošana; samaisīšana ar augsnes sastāvdaļām; augsnes sadalīšana testēšanas traukos; līdzsvara iestāšanās testēšanas apstākļos četras dienas (trīs nedēļas ar metālu piesātinātai augsnei).
– 3 līdz – 1	Testēšanas organismu izņemšana no kultūras aklimatizācijai; augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana.
0	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes paraugu paņemšana no apstrādātajiem traukiem un šķīdinātāju kontroles traukiem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju; barības devas pievienošana; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; pietiekamu tārpu apakšparaugu paturēšana, lai noteiktu analītiskās pamatvērtības, mitro un saussvaru un tauku saturu; visu testēšanas trauku svēršana, lai kontrolētu augsnes mitrumu; gaisa padeves kontrole, ja izmanto slēgtu testēšanas sistēmu.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
8–9	Tāpat kā 3. diena.
10	Tāpat kā 1. diena.
11–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
15–16	Tāpat kā 3. diena.
17	Tāpat kā 1. diena.
18–20	Tāpat kā 3. diena.

▼**M4**

Diena	Darbība
21	Tāpat kā 1. diena; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; uzņemšanas fāzes beigas; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni, lai sāktu noārdīšanās fāzi (bez zarnu iztīrīšanas); augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Pirmsekspozīcijas darbības (līdzsvara iestāšanās fāze) jāparedz, ņemot vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdienās).

b) Noārdīšanās fāze

Diena	Darbība
– 6	Augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana; sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes sastāvdaļu samaisīšana; augsnes sadalīšana pa testēšanas traukiem; inkubācija testa apstākļos četras dienas.
0 (uzņemšanas fāzes beigas)	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; barības devas pievienošana; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni; augsnes un tārpu paraugu ņemšana pēc 4–6 h, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
8–9	Tāpat kā 3. diena.
10	Tāpat kā 1. diena.
11–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
15–16	Tāpat kā 3. diena.
17	Tāpat kā 1. diena.

▼M4

Diena	Darbība
18–20	Tāpat kā 3. diena.
21	Tāpat kā 1. diena; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Augsne pirms noārdīšanās fāzes sākuma jāsagatavo tāpat kā pirms uzņemšanas fāzes.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdienās).

Tests ar enhitreīdiem

a) Uzņemšanas fāze ar astoņu paraugu ņemšanas datumiem, ko izmanto kinētikas aprēķiniem

Diena	Darbība
– 6	Sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes daļas piesātināšana ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu; šķīdinātāja, ja lietots, iztvaikošana; samaisīšana ar augsnes sastāvdaļām; augsnes sadalīšana testēšanas traukos; līdzsvara iestāšanās testēšanas apstākļos četras dienas (trīs nedēļas ar metālu piesātinātai augsnei).
– 3 līdz – 1	Testēšanas organismu izņemšana no kultūras aklimatizācijai; augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana.
0	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes paraugu paņemšana no apstrādātajiem traukiem un šķīdinātāju kontroles traukiem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju; barības devas pievienošana augsnei; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; pietiekamu tārpu apakšparaugu paturēšana, lai noteiktu analītiskās pamatvērtības, mitro un saussvaru un tauku saturu; visu testēšanas trauku svēršana, lai kontrolētu augsnes mitrumu; gaisa padeves kontrole, ja izmanto slēgtu testēšanas sistēmu.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana augsnei; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
9	Tāpat kā 1. diena.
10	Tāpat kā 3. diena.

▼**M4**

Diena	Darbība
11	Tāpat kā 1. diena.
12–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana augsnei; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; uzņemšanas fāzes beigas; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni, lai sāktu noārdīšanās fāzi (bez zarnu iztīrīšanas); augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Pirmsekspozīcijas darbības (līdzsvara iestāšanās fāze) jāparedz, ņemot vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdienās).

▼M4

4. papildinājums

Mākslīga augsne – sagatavošanas un glabāšanas ieteikumi

Tā kā visu gadu var nebūt pieejamas dabīgas augsnes no konkrēta avota un tā kā vietējie organismi, kā arī mikropiesārņotāju klātesība var ietekmēt testēšanu, šajā testā ir ieteicams izmantot mākslīgu substrātu, proti, mākslīgu augsni saskaņā ar šā pielikuma C.8. nodaļu "Toksicitātes noteikšana sliekām"(48). Vairākas testēšanas sugas spēj izdzīvot, augt un vairoties šādā augsnē, turklāt ir nodrošināta pēc iespējas lielāka standartizācija, kā arī testēšanas un kultivēšanas apstākļu salīdzināmība laboratorijas ietvaros un starp laboratorijām.

Augsnes sastāvdaļas

Kūdra	10 %	Sfagnu kūdra saskaņā ar ESAO Pamatnostādnēm Nr. 207 (48).
Kvarca smiltis	70 %	Rūpnieciskās kvarca smiltis (izžāvētas ar gaisu); daļiņu izmērs: vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā, bet visām daļiņām jābūt ≤ 2 mm.
Kaolīna māli	20 %	Kaolinīta saturs: ≥ 30 %.
Kalcija karbonāts	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulverizēts, ķīmiski tīrs.

Ir iespējams arī samazināt mākslīgās augsnes organiskā oglekļa saturu, piemēram, samazinot kūdras saturu līdz 4–5 % no sausas augsnes un attiecīgi palielinot smilšu saturu. Šādi samazinot organiskā oglekļa saturu, var samazināt testējamās ķīmiskās vielas adsorbcijas iespējas augsnē (organiskajā ogleklī) un palielināt testējamās ķīmiskās vielas pieejamību tārpiem (74). Ir pierādīts, ka *Enchytraeus albidus* un *Eisenia fetida* var nodrošināt atbilstību derīguma kritērijiem par vairošanos, ja tos testē lauka augsnē ar zemāku organiskā oglekļa saturu, piemēram, 2,7 % (33) (61), kā arī ir gūta pieredze, ka to var panākt arī ar mākslīgu augsni, kuras kūdras saturs ir 5 %.

Sagatavošana

Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi samaisa (piemēram, liela izmēra laboratorijas maisītājā). Tas jādara aptuveni vienu nedēļu pirms testa sākšanas. Samaisītās augsnes sausās sastāvdaļas ir jāmitrina ar dejonizētu ūdeni vismaz 48 h pirms testējamās vielas pievienošanas, lai līdzsvarotu/stabilizētu skābumu. Lai noteiktu pH, izmanto augsnes un 1 M KCl šķīduma maisījumu 1:5 attiecībā. Ja pH vērtība nav vajadzīgajā diapazonā (6,0 ± 0,5), augsnei pievieno pietiekamu daudzumu $CaCO_3$ vai sagatavo jaunu augsnes sēriju.

Mākslīgas augsnes maksimālo ūdens aiztures spēju (turpmāk – *WHC*) nosaka saskaņā ar ISO 11268-2 (35). Vismaz divas dienas pirms testa sākšanas sauso mākslīgo augsni mitrina, pievienojot pietiekami daudz dejonizēta vai rekonstituēta ūdens, lai iegūtu aptuveni pusi no galīgā ūdens satura. Galīgajam ūdens saturam jābūt 40–60 % no maksimālās *WHC*. Testēšanas sākumā iepriekš samitrināto augsni sadala tādā skaitā daļu, cik daudz ir testēšanas koncentrāciju un testēšanā izmantoto kontroles trauku, un mitruma saturu koriģē 40–60 % apmērā no maksimālās ūdens aiztures spējas (turpmāk – WHC_{max}), izmantojot testējamās vielas šķīdumu un/vai pievienojot dejonizētu vai rekonstituētu ūdeni. Mitruma saturu nosaka testēšanas sākumā un beigās (pie 105 °C). Tam jābūt optimāli piemērotam sugu vajadzībām (mitruma saturu var pārbaudīt arī šādi: kad augsni maigi saspiež rokā, starp pirkstiem jāparādās mazām ūdens pilītēm).

▼M4

Glabāšana

Mākslīgās augsnes sausās sastāvdaļas var uzglabāt istabas temperatūrā līdz izmantošanai. Sagatavoto, iepriekš samitrināto augsni var uzglabāt vēsā vietā ne ilgāk kā trīs dienas pirms tās piesātināšanas. Jācenšas pēc iespējas samazināt ūdens iztvaikošanu. Ar testējamo vielu piesātināta augsne ir jāizmanto nekavējoties, ja vien nav pieejama informācija, kas norāda, ka konkrēto augsni var uzglabāt un ka tas neietekmē testējamās vielas toksicitāti un bioloģisko pieejamību. Pēc tam piesātinātās augsnes paraugus var uzglabāt konkrētajai testējamajai vielai ieteiktajos apstākļos līdz analīzes veikšanai.

▼M4

5. papildinājums

Sauszemes mazsartārpu sugas, kas ir ieteicamas testiem par bioakumulāciju no augsnes

Sliekas

Ieteicamā testēšanas suga ir *Eisenia fetida* (*Savigny*, 1826. gads), kas piederīga *Lumbricidae* dzimtai. Kopš 1972. gada tā ir iedalīta divās apakšsugās (*Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* (10)). Saskaņā ar *Jaenike* (36) tās ir īstas, atsevišķas sugas. *Eisenia fetida* var viegli atpazīt pēc tās gaiši dzeltenajām starpposmu svītrām, savukārt *Eisenia andrei* ir vienveidīga, tumši sarkana krāsa. Sākotnēji šīs sugas, visticamāk, izveidojušās Melnās jūras reģionā, taču pašlaik sastopamas visā pasaulē, it sevišķi antropogēni izmainītās dzīvotnēs, piemēram, komposta kaudzēs. Abas sugas var izmantot ekotoksikoloģijas un bioakumulācijas testiem.

Eisenia fetida un *Eisenia andrei* ir plaši pieejamas, piemēram, kā zivju ēsma. Salīdzinājumā ar citām *Lumbricidae* dzimtas sliekām tām ir īss dzīves cikls, un briedumu tās sasniedz aptuveni 2–3 mēnešu laikā (istabas temperatūrā). To optimālā vides temperatūra ir aptuveni 20–24 °C. Tās dod priekšroku samērā mitriem substrātiem ar gandrīz neitrālu pH un augstu organiskā materiāla saturu. Tā kā šīs sugas ir tikušas plaši izmantotas standartizētos ekotoksikoloģijas testos jau aptuveni 25 gadus, to kultivēšana ir stabili iedibināta (48) (77).

Abas sugas var audzēt daudzās dažādās dzīvnieku izcelsmes atliekās. Ieteicamā pavairošanas barotne saskaņā ar ISO (35) ir 50:50 maisījums no zirgu vai liellopu mēsliem un kūdras. Barotnes pH vērtībai jābūt aptuveni 6–7 (koriģē ar kalcija karbonātu), jābūt zemai jonu vadītspējai (zem 6 mS/cm vai sāls koncentrācija zem 0,5 %), un tā nedrīkst būt pārmērīgi piesārņota ar amonjaku vai dzīvnieku urīnu. Turklāt var izmantot tirdzniecībā pieejamu dārzniecības augsni bez piedevām vai mākslīgu augsni saskaņā ar ESAO (48), vai 50:50 šo abu substrātu maisījumu. Substrātam jābūt mitram, bet ne pārāk slapjam. Ir piemērotas pavairošanas kastes ar 10–50 litru tilpumu.

Lai iegūtu standarta vecuma un svara tārpus, kultivēšanu ieteicams sākt ar kokoniem. Tāpēc pavairošanas kastē ar svaigu substrātu ielaiž pieaugušus tārpus, lai tie izveidotu kokonus. Praktiskā pieredze ir parādījusi, ka populācijas blīvums aptuveni 100 pieaugušu tārpu apmērā uz kilogramu substrāta (mitrais svars) nodrošina labus vairošanās rādītājus. Pēc 28 dienām pieaugušos tārpus izņem no kastes. No kokoniem izšķīlušās sliekas izmanto testēšanā, kad tās ir nobriedušas vismaz pēc diviem mēnešiem, bet ne vēlāk kā pēc 12 mēnešiem.

Iepriekš aprakstīto sugu tārpus var uzskatīt par veselīgiem, ja tie pārvietojas cauri substrātam, necenšas substrātu pamest un nepārtraukti vairojas. Ļoti lēna pārvietošanās vai dzeltena aizmugures daļa (*Eisenia fetida* gadījumā) liecina par substrāta noplicināšanos. Tādā gadījumā ieteicams svaigs substrāts un/vai mazāks skaits dzīvnieku vienā kastē.

Atlasītas papildu atsauces

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.

Enhitreīdi

Ieteicamā testēšanas suga ir *Enchytraeus albidus* (*Henle*, 1837. gads) (baltie tārpi). *Enchytraeus albidus* ir viena no lielākajām (līdz 15 mm) sugām posmtārpu mazsartārpu *Enchytraeidae* dzimtā un ir sastopama visā pasaulē, piemēram, atsauce (8). *Enchytraeus albidus* ir sastopama jūras, saldūdens un zemes dzīvotnēs, galvenokārt trūdošās organiskās vielās (jūraszāle, komposts) un reti pļavās (42). Šīs sugas sastopamība ļoti dažādās ekosistēmās un dažas morfoloģiskas variācijas liecina, ka tai varētu būt dažādas ciltis.

Enchytraeus albidus ir pieejama tirdzniecībā, to pārdod kā zivju barību. Ir jāpārbauda, vai kultūra nav piesārņota ar citu kultūru, parasti ar mazākām sugām (60). Ja notikusi piesārņošanās, visi tārpi ir jānomazgā ar ūdeni Petri traukā. Pēc tam izvēlas lielus pieaugušus *Enchytraeus albidus* īpatņus (izmantojot stereomikroskopu), lai uzsāktu kultivēšanu. No visiem pārējiem tārpiem atbrīvojas. Šīs sugas dzīves cikls ir īss, jo briedums tiek sasniegts 33. dienā (pie 18 °C) līdz 74. dienā (pie 12 °C). Testēšanai jāizmanto tikai tādas kultūras, kas ir noturētas laboratorijā vismaz piecas nedēļas (viena paaudze) un nav uzrādījušas problēmas.

Ir piemērotas arī citas *Enchytraeus* ģints sugas, it sevišķi *Enchytraeus luxuriosus*. Šī suga ir īsts augsnes iedzīvotājs, kas ir no jauna aprakstīts atsaucē (65). Ja izmanto citas *Enchytraeus* sugas, tās ir skaidri jāidentificē un pārskatā jāsniedz pamatojums, kādēļ izraudzīta šī suga.

Enchytraeus crypticus (*Westheide* un *Graefe*, 1992. gads) ir suga, kas piederīga tai pašai grupai, kurai piederīga *Enchytraeus luxuriosus*. Šī suga nav pārliecinoši konstatēta lauka vidē un ir aprakstīta tikai saistībā ar slieku kultūrām un komposta kaudzēm (*Römbke*, 2003. gads). Tāpēc nav zināmas tās sākotnējās ekoloģiskās vajadzības. Tomēr nesen veikti laboratorijas pētījumi ar dažādām lauka augsnēm ir apstiprinājuši, ka šī suga ļoti labi panes dažādas augsnes īpašības, piemēram, pH un augsnes struktūru (*Jänsch et al.*, 2005. gads). Pēdējos gados šī suga ir bieži tikusi izmantota ekotoksikoloģijas pētījumos, pateicoties tās pavairošanas un testēšanas vienkāršībai (piemēram, *Kuperman et al.*, 2003. gads). Tomēr šīs sugas tārpi ir maza izmēra (3–12 mm; vidēji: 7 mm (*Westheide* un *Müller*, 1996. gads), kas apgrūtina darbu ar tiem salīdzinājumā ar *Enchytraeus albidus*. Izmantojot šo sugu *Enchytraeus albidus* vietā, testēšanas trauks var būt mazāks, bet tas nav obligāti. Turklāt jāņem vērā, ka šī suga ļoti ātri vairojas un ka vienas paaudzes nobriešanas laiks ir mazāk nekā 20 dienas 20 ± 2 °C (*Achazi et al.*, 1999. gads) un pat mazāks augstākās temperatūrās.

Enchytraeus albidus sugu enhitreīdus (kā arī citas *Enchytraeus* sugas) var pavairot lielās plastmasas kastēs (piemēram, 30 × 60 × 10 cm vai 20 × 12 × 8 cm, kas ir piemērotas maza izmēra tārpu kultivēšanai), kuras piepildītas ar mākslīgas augsnes maisījumu un tirdzniecībā pieejamu, nepiesārņotu dārzniecības augsni bez piedevām. Jāizvairās no komposta materiāla izmantošanas, jo tas var saturēt toksiskas ķīmiskās vielas, piemēram, smagos metālus. Pavairošanas augsne pirms izmantošanas ir jāatbrīvo no faunas, tris reizes to sasaldējot. Var izmantot arī tīru mākslīgo augsni, bet tādā gadījumā vairošanās ātrums varētu būt lēnāks salīdzinājumā ar ātrumu jauktos substrātos. Substrāta pH jābūt 6,0 ± 0,5. Kultūru tur inkubatorā 15 ± 2 °C temperatūrā bez gaismas. Katrā ziņā jāizvairās no temperatūras virs 23 °C. Mākslīgajai/dabīgajai augsnei jābūt mitrai, bet ne slapjai. Kad augsni maigi saspiež rokā, jāparādās mazām ūdens pilītēm. Noteikti jāizvairās no bezskābekļa apstākļiem (piemēram, ja izmanto vāku, vāka caurumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu gaisa apmaiņu). Pavairošanas augsnei ir jānodrošina aerācija, to uzmanīgi apmaisot reizi nedēļā.

▼M4

Tārpi ir jābaro vismaz reizi nedēļā *ad libitum* ar placinātām auzām, ko izvieto dobumā uz augsnes virsmas un apklāj ar augsni. Ja tvertnē joprojām ir barība no iepriekšējās barošanas reizes, atbilstīgi jākoriģē barības deva. Ja uz atlikušās barības izveidojas pelējumsēnītes, tā jāaizvieto ar jaunu daudzumu placinātu auzu. Lai stimulētu vairošanos, placinātās auzas reizi divās nedēļās var papildināt ar tirdzniecībā pieejamu, vitamīniem bagātinātu olbaltumvielu pulveri. Pēc trijiem mēnešiem dzīvniekus pārvieto uz svaigi sagatavotu kultūru vai pavairošanas substrātu. Placinātās auzas, kas jāglabā hermētiski noslēgtos traukos, ir jāievieto autoklāvā vai jāuzkarsē pirms izmantošanas, lai izvairītos no infekcijām ar miltu ērcēm (piemēram, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) vai plēsīgām ērcēm (piemēram, *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Pēc dezinfekcijas barību samaļ, lai to varētu viegli izkaisīt uz augsnes virsmas. Vēl par barību var izmantot maizes raugu vai zivju barību *TetraMin*®.

Kopumā kultivēšanas apstākļi ir pietiekami, ja tārpi necenšas pamest substrātu, ātri pārvietojas cauri augsnei, tiem ir spīdīga ārējā virsma, pie kuras nelīp augsnes daļiņas, tie ir vairāk vai mazāk balti un ja ir redzami dažāda vecuma tārpi. Faktiski tārpus var uzskatīt par veselīgiem, ja tie nepārtraukti vairojas.

Atlasītas papildu atsauces

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. SAUSZEMES AUGU TESTS: DĪGSTU UZDĪGŠANAS UN DĪGSTU AUGŠANAS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 208 (2006. gads). Testēšanas metodes tiek regulāri pārskatītas, ņemot vērā zinātnes attīstību un piemērojamību izmantošanai regulējumā. Šī atjauninātā testa metode ir izstrādāta, lai novērtētu ķīmisko vielu iespējamo ietekmi uz dīgstu uzdīgšanu un augšanu. Tā neattiecas uz hronisku ietekmi vai ietekmi uz vairošanos (t. i., sēklu un ziedu veidošanos, augļu nobriešanu). Lai nodrošinātu, ka tiek izmantotas atbilstošas testēšanas metodes (piemēram, testējot metālus/metāla savienojumus, jāņem vērā pH un saistīto pretēji lādēto jonu ietekme), jāņem vērā ekspozīcijas apstākļi un testējamās ķīmiskās vielas īpašības (1). Šī testa metode neattiecas uz augiem, kas pakļauti ķīmisko vielu izgarojumiem. Testa metode ir piemērojama vispārēju ķīmisko vielu, biocīdu un kultūraugu aizsardzības līdzekļu (ko dēvē arī par augu aizsardzības līdzekļiem vai pesticīdiem) testēšanai. Tā ir izstrādāta, pamatojoties uz esošām metodēm (2)(3)(4)(5)(6)(7). Tika ņemtas vērā arī citas atsauces, kas attiecas uz augu testēšanu (8)(9)(10). Izmantotās definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

2. Testā izvērtē ietekmi uz augstāko augu dīgstu uzdīgšanu un agrīnu augšanu pēc ekspozīcijas testējamai ķīmiskajai vielai augsnē (vai citā piemērotā augsnes matricā). Sēklas novieto saskarē ar augsni, kas apstrādāta ar testējamo ķīmisko vielu, un ietekmi parasti novērtē 14 līdz 21 dienu pēc tam, kad kontrolgrupā uzdīgst 50 % dīgstu. Izmērāmais mērķis ir vizuāls dīgstu uzdīgšanas novērtējums, asnu saussvars (alternatīvi – asnu svaigsvars) un atsevišķos gadījumos asnu garuma novērtējums, kā arī redzamas kaitīgas ietekmes uz dažādām auga daļām novērtējums. Šos mērījumus un novērojumus salīdzina ar neapstrādātu kontrolgrupas augu rezultātiem.

3. Atkarībā no prognozējamā ekspozīcijas ceļa testējamā ķīmiskā viela ir jāiestrādā augsnē (vai, iespējams, mākslīgā augsnes matricā) vai ar to jāapstrādā augsnes virskārta, kas pienācīgi atspoguļo iespējamo ķīmiskās vielas ekspozīcijas ceļu. Iestrādi augsnē veic, apstrādājot tādu augsni, kas ņemta ārpus rizosfēras. Pēc augsnes apstrādes to pārvieto uz podiņiem, tad attiecīgo augu sugu sēklas iesētj augsnē. Virsmas apstrādi veic jau podiņos ievietotai augsnei, kurā sēklas jau ir iesētas. Testa vienības (kontrolgrupas un apstrādātas augsnes ar sēklām) pēc tam novieto atbilstošos apstākļos, lai veicinātu dīgšanu/augšanu.

4. Atkarībā no pētījuma mērķa testu var veikt, lai noteiktu devas un atbildreakcijas līkni vai kā robežtestu vienai koncentrācijai/rādītājam. Ja vienas koncentrācijas/rādītāja testa rezultāti pārsniedz noteiktu toksiskuma līmeni (piemēram, novēro ietekmi, kas lielāka par x %), veic diapazona noteikšanas testu, lai noteiktu augšējo un apakšējo toksicitātes robežu, pēc tam veicot vairākus koncentrācijas/ rādītāja testus, lai izveidotu devas un atbildreakcijas līkni. Jāizmanto piemērota statistiskā analīze, lai noskaidrotu iedarbīgo koncentrāciju EC_x vai iedarbīgo apstrādes rādītāju ER_x (piemēram, EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) attiecībā uz visjutīgāko interesējošo parametru vai parametriem. Tāpat arī šajā testā var aprēķināt nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)* un zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju *(LOEC)*.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

5. Turpmāk minētā informācija ir noderīga ķīmiskās vielas paredzamā ekspozīcijas ceļa identifikācijai un testa izstrādāšanai: struktūrformula, tīrības

▼M6

pakāpe, šķīdība ūdenī, šķīdība organiskos šķīdinātājos, 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficients, augsnes sorbcijas spēja, tvaika spiediens, ķīmiskā stabilitāte ūdenī un gaismā un bioloģiskās noārdīšanās spēja.

TESTA DERĪGUMS

6. Lai testu varētu uzskatīt par derīgu, kontrolgrupām jāatbilst šādiem testa kritērijiem:

— dīgstu uzdīgšana ir vismaz 70 %;

— dīgstiem nav redzama fitotoksiska ietekme (piemēram, hloroze, nekroze, vīte, lapu un stublāja deformācijas), un augi uzrāda tikai konkrētās sugas augšanas un morfoloģijas parastās variācijas;

— pētījuma laikā vidējais izdīgušo kontrolgrupas dīgstu izdzīvošanas rādītājs ir vismaz 90 %;

— konkrētās sugas vidiskie apstākļi ir identiski, un barotne satur vienādu daudzumu augsnes matricas, augšanas veicināšanas barotnes vai tā paša avota substrāta.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

7. Ķīmisko standartvielu var regulāri testēt, lai pārliecinātos, ka testa veiktspēja un konkrēto testa augu atbildreakcija, kā arī testa apstākļi laika gaitā nav būtiski mainījušies. Alternatīvi kontrolgrupās veiktus vēsturiskos biomasas vai augšanas mērījumus var izmantot, lai novērtētu testa sistēmas veiktspēju konkrētā laboratorijā, un tos var izmantot par laboratorijas iekšējās kvalitātes kontroles pasākumiem.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Dabiska augsne – mākslīgs substrāts

8. Augus var audzēt podos, izmantojot smilšainu smilšmālu, smilšmālainu smilti vai smilšainu, mālainu smilšmālu, kas satur līdz 1,5 procentiem organiskā oglekļa (aptuveni 3 procenti organisko vielu). Var izmantot arī komerciālo stādu augsni vai sintētisko augsnes maisījumu, kas satur līdz 1,5 procentus organiskā oglekļa. Mālainas augsnes nevajadzētu lietot, ja ir zināms, ka testējamajai ķīmiskajai viela ir augsta māltiece. Lauka augsne jāizsijā līdz 2 mm daļiņu lielumam, lai to homogenizētu un atdalītu rupjās daļiņas. Pārskatā jāiekļauj informācija par gatavās augsnes veidu un tekstūru, organiskā oglekļa %, pH līmeni un sāls saturu, kā arī elektrovadītspēju. Augsne ir jāklasificē atbilstoši standarta klasifikācijas shēmai (11). Augsni var pasterizēt vai karsēt, lai samazinātu augsnes patogēnu ietekmi.

9. Dabiska augsne var sarežģīt rezultātu interpretēšanu un mainīgo fizikālķīmisko īpašību un mikroorganismu populāciju dēļ palielināt mainīgumu. Šie mainīgie savukārt ietekmē mitrumnoturspēju, ķīmisko vielu saistīšanas spēju, aerāciju un barības vielu un mikroelementu saturu. Papildus šo fizisko faktoru atšķirībām būs arī ķīmisko īpašību atšķirības, piemēram, atšķirīgs pH līmenis un redokspotenciāls, kas var ietekmēt testējamās ķīmiskās vielas bioloģisko pieejamību (12)(13)(14).

10. Mākslīgos substrātus parasti neizmanto augu aizsardzības līdzekļu testēšanai, taču tie var būt noderīgi vispārēju ķīmisku vielu testēšanai vai gadījumos, kad ir nepieciešams samazināt dabisko augšņu mainīgumu un palielināt testa rezultātu salīdzināmību. Izmantojamajiem substrātiem ir jāsastāv no inertiem materiāliem, lai mazinātu mijiedarbību ar testējamo ķīmisko vielu, ar šķīdinātāja nesēju vai abiem. Skābē mazgātas kvarca smiltis, minerālvate un stikla pērlītes (piemēram, 0,35–0,85 mm diametrā) ir atzītas par

▼M6

piemērotu inertu materiālu, kas minimāli absorbē testējamo ķīmisko vielu (15), nodrošinot, ka ķīmiskā viela būs maksimāli pieejama dīgstiem caur saknēm. Nepiemēroti substrāti ir vermikulīts, perlīts vai citi materiāli ar augstu absorbcijas spēju. Jānodrošina uzturvielas augu augšanai, lai nodrošinātu, ka augi netiek pakļauti stresam barības vielu trūkuma dēļ, un, ja iespējams, tas ir jānovērtē, veicot ķīmiskās analīzes vai vizuāli novērtējot kontrolgrupas augus.

Kritēriji testa sugu atlasei

11. Sugu atlasei jābūt saprātīgi plašai, piemēram, attiecībā uz to taksonomisko daudzveidību augu valstī, to izplatību, pieejamību, konkrētai sugai raksturīgo dzīves ciklu un dabisko areālu, lai iegūtu plašu atbildreakciju klāstu (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Izvēloties iespējamās testa sugas, jāņem vērā turpmāk norādītie rādītāji:

— suga ir vienādas sēklas, kas ir viegli pieejamas no uzticamā standarta sēklu avotā vai avotiem un kam raksturīga konsekventa, uzticama un vienmērīga dīgšana, kā arī vienāda dīgstu augšana;

— augs ir piemērots testēšanai laboratorijā, un ar to var iegūt ticamus un reproducējamus rezultātus vienā un vairākās testēšanas iekārtās;

— testēšanā iekļautās sugas augu jutīgumam jāsaskan ar to augu atbildreakcijām, kas atrodami vidē un eksponēti ķīmiskajai vielai;

— tie jau iepriekš zināmā mērā izmantoti toksicitātes testos, un to izmantošana, piemēram, herbicīdu biotestos, smago metālu skrīningā, sāļuma vai minerālvielu stresa testos vai allelopātijas pētījumos norāda uz to jutīgumu pret daudziem dažādiem faktoriem;

— tie ir piemēroti šajā testa metodē izmantotajiem augšanas apstākļiem;

— tie atbilst testa derīguma kritērijiem.

Dažas no vēsturiski testos visvairāk izmantotajām sugām ir uzskaitītas 2. pielikumā, un potenciālās sugas, kas nav kultūraugi, ir 3. papildinājumā.

12. Testā iekļauto sugu skaits ir atkarīgs no attiecīgajām normatīvajām prasībām, tāpēc tas šajā testa metodē nav norādīts.

Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

13. Ķīmiskā viela ir jāpievieno piemērotam nesējam (piemēram, ūdenim, acetonam, etilspirtam, polietilēnglikolam, akāciju sveķiem (gumiarābikam), smiltij). Var testēt arī maisījumus (preparātus vai preparātu maisījumus), kas satur aktīvās vielas un dažādas palīgvielas.

Iestrāde augsnē/mākslīgā substrātā

14. Ķīmiskās vielas, kas ir ūdenī šķīstošas vai suspendētas ūdenī, var pievienot ūdenim, un pēc tam šķīdumu sajauc ar augsni, izmantojot atbilstošas maisīšanas ierīces. Šī veida testēšana var būt lietderīga, ja ekspozīcija ķīmiskajai vielai notiek caur augsni vai augsnes porūdeni un ja pastāv bažas par uzņemšanu ar saknēm. Pievienojot testējamo ķīmisko vielu, nedrīkst pārsniegt augsnes ūdensnoturspēju. Pievienotā ūdens tilpumam ir jābūt vienādam visās testa koncentrācijās, bet tas jāierobežo, lai novērstu augsnes salipšanu.

▼M6

15. Ķīmiskās vielas ar vāju šķīdību ūdenī izšķīdina piemērotā gaistošā šķīdinātājā (piemēram, acetons, etanols) un sajauc ar smiltīm. Šķīdinātāju pēc tam no smiltīm var atdalīt, izmantojot gaisa plūsmu, vienlaikus nepārtraukti maisot smiltis. Apstrādātās smiltis sajauc ar eksperimentālo augsni. Izveido otro kontrolparaugu, kurā pievieno tikai smiltis un šķīdinātāju. Visiem testa apstrādes paraugiem un otrajam kontrolparaugam pievieno vienādu daudzumu smilšu, kas sajauktas ar šķīdinātāju, kurš pēc tam atdalīts. Cietu, neškīstošu testējamo ķīmisko vielu gadījumā sauso augsni un ķīmisko vielu sajauc piemērotā maisīšanas ierīcē. Pēc tam augsni ieliek podos un nekavējoties iesēj sēklas.

16. Ja augsnes vietā izmanto mākslīgo substrātu, ķīmiskās vielas, kas šķīst ūdenī, var izšķīdināt barības vielu šķīdumā tieši pirms testa sākuma. Ķīmiskās vielas, kas nešķīst ūdenī, bet kuras var suspendēt ūdenī, izmantojot šķīdinātāja nesējvielu, būtu jāpievieno barības vielu šķīdumam kopā ar nesējvielu. Ūdenī nešķīstošas ķīmiskās vielas, kurām nav pieejama netoksiska ūdenī šķīstoša nesējviela, jāizšķīdina piemērotā gaistošā šķīdinātājā. Šķīdumu sajauc ar smiltīm vai stikla pērlītēm, kas novietotas rotācijas vakuumierīcē, un iztvaicē, atstājot uz smiltīm vai lodītēm viendabīgu ķīmiskās vielas pārklājumu. Nosvērta pērlīšu daļa jāekstrahē ar to pašu organisko šķīdinātāju un ķīmiski jātestē, pirms tiek piepildīti stādīšanas konteineri.

Virsas apstrāde

17. Attiecībā uz kultūraugu aizsardzības līdzekļiem apstrādei ar testējamo ķīmisko vielu bieži izmanto augsnes virsas apsmidzināšanu ar testa šķīdumu. Visām iekārtām, ko izmanto testu veikšanai, tostarp iekārtām, ko izmanto testējamās ķīmiskas vielas sagatavošanai un administrēšanai, jābūt tā konstruētām un ar tādu jaudu, lai testus ar šo ierīci varētu veikt pareizi un tie nodrošinātu reproducējamu pārklājumu. Visa augsnes virsa jānoklāj vienmērīgi. Būtu jāizvairās no situācijas, kad ķīmiskā vielu tiek adsorbēta vai reaģē ar aprīkojumu (piemēram, plastmasas caurulēm un lipofilajām ķīmiskajām vielām vai tērauda daļām un elementiem). Testējamo ķīmisko vielu izsmidzina uz augsnes virsas, imitējot tipisku uzklāšanu ar izsmidzinātāju. Kopumā izsmidzināšanas apjomam jābūt atbilstošiem parastā lauksaimniecības praksē izmantotajam un apjoms (ūdens daudzums utt.) ir jāietver pārskatā. Jāizvēlas tāds sprauslu veids, kas nodrošina vienmērīgu augsnes virsas noklāšanu. Ja tiek izmantoti šķīdinātāji un nesējvielas, jāizveido otra kontrolaugu kopa, kas saņem tikai šķīdinātāju/nesējvielu. Tas nav jādara, ja augu aizsardzības līdzekļus testē kā preparātus.

Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas/rādītāja verifikācija

18. Apstrādes koncentrācijas/rādītāji jāapstiprina, veicot attiecīgu analītisko verifikāciju. Šķīstošām vielām visas testa koncentrācijas/rādītājus var verificēt un apstiprināt, analizējot augstāko testā izmantoto šķīduma koncentrāciju, dokumentējot turpmāko atšķaidīšanu un izmantojot kalibrētas vielas uzklāšanas iekārtas (piemēram, kalibrēti analītiskie stikla trauki, smidzinātāja iekārtas kalibrēšana). Neškīstošām ķīmiskajām vielām sastāvdaļu materiāla verifikācija jānodrošina ar augsnei pievienotās testējamās ķīmiskās vielas nosvēršanu. Ja nepieciešams uzrādīt homogenitāti, var būt nepieciešams veikt augsnes analīzes.

PROCEDŪRA

Testēšanas plāns

19. Vienas sugas sēklas tiek iesētas podos. Podos iesēto augu sēklu skaits ir atkarīgs no augu sugas, poda izmēra un testa ilguma. Jānodrošina tāds augu skaits podā, lai būtu atbilstoši augšanas apstākļi un podi testa veikšanas laikā nebūtu pārblīvēti. Maksimālais augu blīvums ir aptuveni 3–10 sēklas uz 100 cm^2, atkarībā no sēklu izmēra. Piemēram, ieteicams viens vai divi kukurūzas, sojas pupiņu, tomātu, gurķu vai cukurbiešu augi 15 cm traukā, trīs rapša vai zirņu augi 15 cm traukā un 5 līdz 10 sīpolu, kviešu, vai citu

▼M6

sīku sēklu 15 cm traukā. Sēklu skaitam un replikātu podu (replikāts saskaņā ar definīciju ir pods, tāpēc augi vienā podā neveido replikātu) skaitam jābūt pietiekamam optimālai statistiskai analīzei (21). Jāievēro, ka mainīgums būs lielāks tām testa sugām, kurām izmanto mazāku skaitu lielu sēklu vienā podā (replikātā), salīdzinot ar testa sugām, kurām katrā podā iespējams izmantot lielāku skaitu sīku sēklu. Stādot vienādu skaitu sēklu katrā podā, šo mainību var samazināt līdz minimumam.

20. Kontrolgrupas izmanto, lai nodrošinātu, ka novērotā ietekme ir saistīta tikai ar ekspozīciju testējamai ķīmiskajai vielai vai attiecināma uz to. Atbilstošajai kontrolgrupai ir visos aspektos jābūt identiskai testa grupai, izņemot to, ka tā netiek eksponēta testējamai ķīmiskajai vielai. Attiecīgajā testā visiem testa augiem, tostarp kontrolgrupai, vajadzētu būt no viena avota. Lai novērstu neobjektivitāti, testa un kontrolgrupas podi jāizraugās pēc nejaušības principa.

21. Būtu jāizvairās izmantot sēklas, kas pārklātas ar insekticīdu vai fungicīdu (t. i., "apstrādātas" sēklas). Tomēr dažas regulējošās iestādes atļauj noteiktu ārpussistēmas saskares fungicīdu (piemēram, kaptāna, tirama) lietošanu (22). Ja ir bažas par patogēniem sēklās, sēklas uz neilgu laiku var iemērkt vājā 5 % hipohlorīta šķīdumā, pēc tam kārtīgi noskalot tekošā ūdenī un izžāvēt. Nav atļauta nekāda korektīva apstrāde ar citu augu aizsardzības līdzekli.

Testa apstākļi

22. Testa apstākļi būtu jātuvina tiem apstākļiem, kas nepieciešami normālai testa sugu un varietāšu augšanai (4. papildinājumā ir norādīti testa apstākļu piemēri). Arī dīgstošie augi jātur atbilstoši labai dārzkopības praksei kontrolētas vides kamerās, augšanas kamerās vai siltumnīcās. Izmantojot augšanas iekārtas, šāda prakse parasti ietver kontroli un šādu datu pietiekami biežu (piemēram, ik dienas) reģistrāciju: temperatūra, mitrums, oglekļa dioksīda koncentrācija, gaisma (intensitāte, viļņu garums, fotosintēzes aktivitātei atbilstošā spektra daļa) un gaismas periodu, laistīšanas līdzekļi utt., lai nodrošinātu labu augšanu, ko novērtē ar izraudzītās sugas kontrolaugiem. Siltumnīcā temperatūru kontrolē, izmantojot ventilēšanas, apkures un/vai dzesēšanas sistēmas. Turpmāk norādīti apstākļi, kas ieteicami testēšanai siltumnīcās:

— temperatūra: 22 °C ± 10 °C;

— mitrums: 70 % ± 25 %;

— fotoperiods: gaisma vismaz 16 stundas;

— gaismas intensitāte: 350 ± 50 μE/m^2/s. Ja gaismas intensitāte nokrītas zem 200 μE/m^2/s, viļņu garuma 400–700 nm, var būt nepieciešama papildu apgaismošana, izņemot noteiktām sugām, kuru prasības pēc gaismas ir zemākas.

Pētījuma laikā jāmonitorē un pārskatā jāiekļauj informācija par vides apstākļiem. Augi audzējami neporainos plastmasas vai glazētos podos ar paplāti

▼M6

vai paliktni zem tiem. Laiku pa laikam podi ir jāpārvieto, lai līdz minimumam samazinātu mainību augu augšanā (audzēšanas iekārtu testēšanas apstākļu atšķirību dēļ). Podiem ir jābūt pietiekami lieliem, lai nodrošinātu normālu augšanu.

23. Augsnes barības vielas var papildināt, cik nepieciešams, lai uzturētu labu dzīvotspēju. Par papildu barības vielu nepieciešamību un padeves laiku var spriest, novērojot kontrolaugus. Testa konteineros ieteicama laistīšana no apakšas (piemēram, izmantojot stikla šķiedras daktis). Tomēr sākotnēji var izmantot laistīšanu no augšas, lai stimulētu sēklu dīgšanu; paraugos, kur veikta augsnes virsas apstrāde, tas atvieglos ķīmiskās vielas virzību augsnē.

24. Konkrētajiem augšanas apstākļiem ir jābūt piemērotiem testa sugām un testējamajām ķīmiskajām vielām. Kontrolaugi un apstrādātie augi ir jāglabā vienādos vides apstākļos, tomēr būtu jāveic piemēroti pasākumi, lai novērstu šķērsekspozīciju (piemēram, gaistošām ķīmiskajām vielām) starp dažādiem apstrādes testējamās ķīmiskās vielas paraugiem un kontrolgrupām.

Vienas koncentrācijas/rādītāja testēšana

25. Lai noteiktu ķīmiskās vielas koncentrāciju/rādītāju, ar kuru veikt vienas koncentrācijas/rādītāja (provocēšanas/robežas) testu, ir jāņem vērā vairāki faktori. Vispārējām ķīmiskām vielām tie ietver arī vielas fizikālķīmiskās īpašības. Attiecībā uz augu aizsardzības līdzekļiem jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības un izmantošanas modelis, testējamās ķīmiskās vielas maksimālā koncentrācija vai lietojuma deva, lietošanas reižu skaits vienā sezonā un/vai noturība. Lai noteiktu, vai vispārējai ķīmiskai vielai piemīt fitotoksiskas īpašības, to var būt lietderīgi pārbaudīt testā maksimālajā līmenī – 1 000 mg/kg sausas augsnes.

Diapazona noteikšanas tests

26. Ja nepieciešams, diapazona noteikšanas testu var veikt, lai gūtu norādījumus par koncentrācijām/rādītājiem, kas jātestē galīgajā devas un atbildreakcijas pētījumā. Diapazona noteikšanas testā testa koncentrācijām/rādītājiem jābūt ar plašiem intervāliem (piemēram, 0,1, 1,0, 10, 100 un 1 000 mg/kg sausas augsnes). Augu aizsardzības līdzekļu koncentrācijas/rādītāji varētu būt balstīti uz ieteicamo vai maksimālo koncentrāciju vai lietošanas rādītāju, piemēram, 1/100, 1/10, 1/1 no ieteicamās/maksimālās koncentrācijas vai lietošanas rādītāja.

Vairāku koncentrāciju/daudzumu testēšana

27. Vairāku koncentrāciju/rādītāju testa mērķis ir noteikt devas un atbildreakcijas sakarību un noteikt EC_x vai ER_x vērtību uzdīgšanai, biomasai un/vai redzamajai ietekmei, salīdzinot ar kontrolgrupām, kuras nav eksponētas vielai, saskaņā ar pārvaldes iestāžu prasībām.

28. Koncentrāciju vai rādītāju skaitam un intervāliem būtu jābūt pietiekamiem, lai varētu iegūt uzticamu devas un atbildreakcijas sakarību un regresijas vienādojumu, kā arī aplēst EC_x vai ER_x vērtības. Izraudzītajām koncentrācijām/rādītājiem būtu jāietver nosakāmās EC_x vai ER_x vērtības. Piemēram, ja ir nepieciešama EC_{50} vērtība, būtu vēlams veikt testēšanu pie rādītājiem, kas rada 20 līdz 80 % ietekmi. Lai to sasniegtu, ieteicamais testa koncentrāciju/rādītāju skaits ir vismaz pieci ģeometriskā progresijā un neapstrādātā

▼M6

kontrole intervālos ar kvocientu, kas nepārsniedz trīs. Katrā apstrādes grupā un kontrolgrupā ir jābūt vismaz četriem replikātiem un kopā vismaz 20 sēklām. Tādiem augiem, kam ir zema dīgtspēja vai mainīgi augšanas paradumi, var būt nepieciešams izmantot vairāk replikātu, lai uzlabotu testa statistisko jaudu. Ja tiek izmantots lielāks skaits testa koncentrāciju/rādītāju, replikātu skaitu var samazināt. Ja ir jānosaka *NOEC*, var būt nepieciešams izveidot vairāk replikātu, lai panāktu vēlamo statistisko jaudu (23).

Novērojumi

29. Novērošanas periodā, proti, 14 līdz 21 dienu pēc tam, kad ir izdīguši 50 % no kontrolgrupas augiem (arī šķīdinātāja kontrolgrupas augiem, ja tāda ir), augus novēro bieži (vismaz reizi nedēļā, bet, ja iespējams, ik dienas) attiecībā uz to uzdīgšanu un redzamo fitotoksiskumu un mirstību. Testa beigās reģistrē izdzīvojušo augu uzdīgšanas un biomasas procentuālos mērījumus, kā arī redzamo kaitīgo ietekmi uz dažādām auga daļām. Tas ietver uzdīgušo dīgstu izskata anomālijas, kavētu augšanu, hlorozi, krāsas zaudēšanu, mirstību un ietekmi uz augu attīstību. Galīgo biomasu var izmērīt, izmantojot izdzīvojušo augu galīgo vidējo sauso dzinumu svaru, ievācot dzinumus pie augsnes virskārtas un tos žāvējot līdz nemainīgam svaram 60 °C temperatūrā. Galīgo biomasu var mērīt, arī izmantojot svaigu dzinumu svaru. Ja to prasa pārvaldes iestādes, beigupunkts var būt arī dzinumu garums. Būtu jāizmanto vienota vizuālo bojājumu uzskaites sistēma, lai novērtētu toksicitātes atbildreakcijas. Piemēri kvalitatīvā un kvantitatīvā vizuālā novērtējuma veikšanai ir doti atsaucēs (23)(24).

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

Vienas koncentrācijas/rādītāja tests

30. Dati par katru augu sugu ir jāanalizē, izmantojot piemērotu statistisko metodi (21). Jāreģistrē testa koncentrācijas/rādītāja ietekmes līmenis vai arī attiecīgās ietekmes nesasniegšana pie testa koncentrācijas/rādītāja (piemēram, < x % ietekme, novērota pie *y* koncentrācijas vai rādītāja)

Vairāku koncentrāciju/rādītāju tests

31. Devas un atbildreakcijas sakarību nosaka regresijas vienādojuma izteiksmē. Var izmantot dažādus modeļus, piemēram, EC_x vai ER_x noteikšanai (piemēram, EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) un tā uzdīgšanas ticamības robežām var būt piemēroti binārie dati, logita, probita, Veibula, Spīrmena–Kerbera saīsinātā metode. Dīgstu augšanu (svars un garums) kā nepārtrauktus EC_x vai ER_x beigupunktus un to ticamības robežas var aprēķināt, izmantojot atbilstošu regresijas analīzi (piemēram, Brūsa–Ferštēga *(Bruce-Versteeg)* nelineārās regresijas analīzi (25)). Kad vien iespējams, visjutīgākajām sugām R^2 ir jābūt 0,7 vai augstākam un izmantotajām testa koncentrācijām/rādītājiem jāietver 20 % līdz 80 % ietekmes. Ja jānosaka *NOEC*, būtu jādod priekšroka jaudīgu statistisko testu izmantošanai un tie būtu jāizvēlas, balstoties uz datu sadalījumu (21)(26).

Testēšanas pārskats

32. Testēšanas pārskatā jāparāda pētījumu rezultāti, kā arī sīks testa apstākļu apraksts, detalizēta rezultātu apspriešana, datu analīze un analīzes rezultātā izdarītie secinājumi. Jāsniedz arī pārskats tabulas veidā un rezultātu kopsavilkums. Pārskatā iekļauj turpmāk norādītos elementus.

▼M6

Testējamā ķīmiskā viela:

— ķīmiskās vielas identifikācijas dati, attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas īpašības (piemēram, log P_{ow}, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens un informācija par vielas apriti vidē un mijiedarbību ar to, kā arī uzvedība, ja informācija ir pieejama);

— informācija par testa šķīduma pagatavošanu un testa koncentrāciju verifikāciju, kā norādīts 18. punktā.

Testa suga:

— informācija par testa organismu: suga/varietāte, augu dzimtas, zinātniskie un vispārpieņemtie nosaukumi, pēc iespējas sīkāka informācija par sēklu avotu un vēsturi (t. i., piegādātāja nosaukums, dīgtspēja procentos, sēklu lieluma klase, grupas vai partijas numurs, sēklu ievākšanas gads vai augšanas sezona, dīgtspējas novērtējuma datums), dzīvotspēja utt.;

— testēto viendīgļlapju un divdīgļlapju sugu skaits;

— sugu izraudzīšanās pamatojums;

— sēklu uzglabāšanas, apstrādes un uzturēšanas apraksts.

Testa apstākļi:

— testēšanas iekārta (piemēram, augšanas kamera, fitotrons vai siltumnīca);

— testēšanas sistēmas apraksts (piemēram, podu izmēri, podu materiāli un augsnes daudzums);

— augsnes apraksts (augsnes tekstūra vai tips: augsnes daļiņu sadalījums un klasifikācija, fizikālķīmiskās īpašības, tostarp organisko vielu %, organiskā oglekļa % un pH);

— augsnes/substrāta (piemēram, augsnes, mākslīgās augsnes, smiltšu un citu) sagatavošana pirms testa;

— barotnes apraksts, ja tādu izmanto;

— testējamās ķīmiskās vielas lietojums: lietošanas metodes apraksts, aprīkojuma apraksts, ekspozīcijas rādītāji un apjomi, tostarp ķīmiskā verifikācija, kalibrēšanas metodes apraksts un lietošanas laika vides apstākļu apraksts;

— augšanas apstākļi: gaismas intensitāte (piemēram, PAR, fotosintēzes aktivitātei atbilstošā spektra daļa), fotoperiods, maksimālā/minimālā temperatūra, laistīšanas grafiks un metode, mēslošana;

— sēklu skaits podā, augu skaits uz devu, replikātu (podu) skaits uz ekspozīcijas rādītāju;

— kontrolparaugu veids un skaits (negatīvi un/vai pozitīvi kontrolparaugi, arī šķīdinātāja kontrolparaugs, ja tādu izmanto);

— testa ilgums.

Rezultāti:

— tabula par katra replikāta, testa koncentrācijas/rādītāja un sugas beigupunktiem;

— uzdīgušo dīgstu skaits un procentuālais salīdzinājums ar kontrolparaugiem;

— biomasas mērījumi (dzinumu saussvars vai svaigsvars) procentos no kontrolparaugiem;

▼M6

— augu dzinumu garums procentos no kontrolparaugiem, ja to mēra;

— testējamās ķīmiskās vielas iedarbībā radušos redzamo bojājumu procentuālā vērtība un kvalitatīvs un kvantitatīvs redzamo bojājumu apraksts (hloroze, nektroze, vīte, lapu un stublāju deformācija, kā arī nenovērota ietekme), salīdzinot ar kontrolgrupas augiem;

— izmantotās vērtējuma skalas apraksts, ar kuru novērtē redzamos bojājumus, ja tiek sniegts vizuāls vērtējums;

— viena rādītāja pētījumiem pārskatā jāiekļauj bojājumi procentos;

— EC_x vai ER_x (piemēram, EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) vērtības un ar tām saistītās ticamības robežas. Ja ir veikta regresijas analīze, norāda regresijas vienādojuma standartkļūdu un individuālo parametru novērtējuma standartkļūdu (piemēram, virziena koeficients, krustpunkts);

— *NOEC* (un *LOEC*) vērtība, ja tā aprēķināta;

— statistisko procedūru un izmantoto pieņēmumu apraksts;

— šo datu un testētās sugas devas un atbildreakcijas sakarības grafisks attēlojums.

Ziņo par atkāpēm no testa procedūrām, kas aprakstītas šajā testa metodē, un jebkuriem nerakstūrgiem notikumiem testa laikā.

LITERATŪRA

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (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) International Organisation of Standards. (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) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (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. and 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 (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and 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). (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. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and 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 Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Ind. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. *In:* Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and 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. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and 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. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and 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. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. *In:* B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Šā pielikuma C33. nodaļa "Slieku vairošanās tests (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*)".

▼M6

1. papildinājums

Definīcijas

Aktīvā sastāvdaļa (AS) (vai aktīvā viela (AV)) ir viela, ar ko paredzēts nodrošināt īpašu bioloģisko ietekmi (piemēram, insektu kontroli, augu slimību kontroli, nezāļu kontroli apstrādes zonā); to dēvē arī par tehniskās tīrības pakāpes aktīvo sastāvdaļu, aktīvo vielu.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

Kultūraugu aizsardzības līdzekļi *(CPP)* vai augu aizsardzības produkti *(PPP)* , vai pesticīdi ir tādas vielas ar noteiktu bioloģisko aktivitāti, ko ar nolūku lieto kultūraugu aizsargāšanai pret kaitēkļiem (piemēram, sēnīšu slimībām, kukaiņiem un konkurējošiem augiem).

EC_x. X % ietekmes koncentrācija vai ER_x. x % ietekmes rādītājs ir koncentrācija vai rādītājs, kas mērītajā testa beigupunktā rada nelabvēlīgas x % izmaiņas salīdzinājumā ar kontrolgrupu (piemēram, par 25 % vai 50 % samazina dīgstu uzdīgšanu, dzinumu svaru, galīgo augu skaitu vai palielina vizuālos bojājumus, kas attiecīgi atbilstu EC_{25}/ER_{25} vai EC_{50}/ER_{50}).

Uzdīgšana ir koleoptila vai dīgļlapas parādīšanās virs augsnes virsas.

Preparāts ir komerciāls produkts, kas satur aktīvo vielu (aktīvo sastāvdaļu), pazīstams arī kā galapreparāts ([1]) vai tipisks galapatēriņa produkts *(TEP)*.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija *(LOEC)* ir zemākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, pie kuras novērota ietekme. Šajā testā koncentrācijai, kas atbilst *LOEC*, attiecīgajā ekspozīcijas periodā, salīdzinot ar kontrolgrupu, ir statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$) un tā ir augstāka par *NOEC* vērtību.

Nemērķa augi ir augi, kas neatrodas mērķaugu zonā. Attiecībā uz kultūraugu aizsardzības līdzekļiem tas parasti attiecas uz augiem ārpus apstrādes zonas.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija *(NOEC)* ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, pie kuras nav novērota nekāda ietekme. Šajā testā koncentrācijai, kas atbilst *NOEC*, attiecīgajā ekspozīcijas periodā, salīdzinot ar kontrolgrupu, nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

Fitotoksiskums: kaitīgās novirzes (saskaņā ar mērījumiem un vizuālo novērtējumu) no normāla augu izskata un augšanas konkrētas ķīmiskās vielas ietekmē.

Replikāts ir eksperimenta vienība, kas reprezentē kontrolgrupu un/vai apstrādes grupu. Šajos pētījumos audzēšanas pods pēc definīcijas ir replikāts.

Vizuāls novērtējums: vizuālo bojājumu novērtējums, kura pamatā ir auga stāves, augtspēja, anomāliju, hlorozes, nekrozes un vispārējā izskata novērojumi, ko salīdzina ar kontrolgrupu.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

([1]) Galapreparāts: gatavais preparāts, kas satur aktīvo ķīmisko vielu (aktīvo sastāvdaļu) un tiek pārdots tirdzniecībā.

▼**M6**

2. papildinājums

To augu sugu saraksts, kas vēsturiski izmantoti testēšanā

Dzimta	Suga	Vispārpieņemtie nosaukumi
DIVDĪGĻLAPJI (DICOTYLEDONAE)		
Čemurziežu	*Daucus carota*	Savvaļas burkāns
Kurvjziežu	*Helianthus annuus*	Vasaras saulgrieze
Kurvjziežu	*Lactuca sativa*	Dārza salāti
Krustziežu	*Sinapis alba*	Baltā sinepe
Krustziežu	*Brassica campestris var. chinensis*	Ķīnas kāposts
Krustziežu	*Brassica napus*	Rapsis
Krustziežu	*Brassica oleracea var. capitata*	Galviņkāposts
Krustziežu	*Brassica rapa*	Ripsis
Krustziežu	*Lepidium sativum*	Dārza cietķērsa
Krustziežu	*Raphanus sativus*	Rutks (redīss)
Balandu	*Beta vulgaris*	Biete
Ķirbju	*Cucumis sativus*	Lauka gurķis
Tauriņziežu	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Tauriņziežu	*Phaseolus aureus*	Zeltainā pupiņa
Tauriņziežu	*Phaseolus vulgaris*	Parastā pupiņa
Tauriņziežu	*Pisum sativum*	Sējas zirnis
Tauriņziežu	*Trigonella foenum-graecum*	Grieķu trigonella
Tauriņziežu	*Lotus corniculatus*	Ragainais vanagnadziņš
Tauriņziežu	*Trifolium pratense*	Pļavas āboliņš
Tauriņziežu	*Vicia sativa*	Sējas vīķis
Linu	*Linum usitatissimum*	Sējas lins
Sūreņu	*Fagopyrum esculentum*	Sējas griķis
Nakteņu	*Solanum lycopersicon*	Parastais tomāts

▼**M6**

Dzimta	Suga	Vispārpieņemtie nosaukumi
VIENDĪGĻLAPJI (MONOCOTYLEDONAE)		
Liliju	*Allium cepa*	Dārza sīpols
Graudzāļu	*Avena sativa*	Sējas auza
Graudzāļu	*Hordeum vulgare*	Parastais miezis
Graudzāļu	*Lolium perenne*	Daudzgadīgā airene
Graudzāļu	*Oryza sativa*	Sējas rīss
Graudzāļu	*Secale cereale*	Sējas rudzi
Graudzāļu	*Sorghum bicolor*	Parastais sorgo
Graudzāļu	*Triticum aestivum*	Parastais kviesis
Graudzāļu	*Zea mays*	Parastā kukurūza

▼M6

3. papildinājums

Potenciālais saraksts sugām, kas nav kultūraugi

ESAO potenciālās sugas augu toksicitātes testiem

Piezīme: turpmākajā tabulā ir sniegta informācija par 52 sugām, kas nav kultūraugi (katram ierakstam iekavās ir sniegtas atsauces). Uzdīgšanas rādītāji ir aizgūti no publicētās literatūras, un tie ir paredzēti tikai kā vispārēja norāde. Individuālā pieredze var atšķirties atkarībā no sēklu izcelsmes un citiem faktoriem.

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
APIACEAE *Torilis japónica* (Japānas sārtburkšķis)	A, B traucējumu skartas platības, dzīvžogi, ganības (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	aukstā stratifikācija (7, 14, 18, 19), var būt nepieciešama nobriešana (19), dīgšanu inhibē tumsa (1, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5)	PĒC (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (ilgziedu mārpuķīte)	P pļavas, aramlauki, velēnas platības (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	apstarošana neietekmē dīgšanu (18, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14)	PĒC (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (zilā rudzupuķe)	A lauki, ceļmalas, klajas dzīvotnes (16)	4,1–4,9 (4, 14)	L = D (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (2, 4)	PĒC (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (melnā zilgalvīte)	P lauki, ceļmalas, klajas dzīvotnes (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	var būt nepieciešama nobriešana (18, 19), dīgšanu imhibē tumsa (19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 26)	PĒC (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (helēniju ālante)	P mitrāji, traucējumu skartas vietas (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (4)	PĒC (4)	A, F	

02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 2040

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums [1] un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods [2]	Augšanas dziļums (mm) [3]	Dīgšanas ilgums (dienas) [4]	Īpaša apstrāde [5]	Toksicitātes tests [6]	Sēklu piegādātāji [7]	Citas atsauces [8]
Leontodon hispidus (matainā vēlpiene)	P lauki, ceļmalas, traucējumu skartas platības (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	dīgšanu kavē tumsa (17, 18, 19) nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 23)	PĒC (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (pūkainā saulcerīte)	B, P traucējumu skartas vietas (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14, 33)	PĒC (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Kanādas zeltgalvīte)	P ganības, klajas dzīvotnes (16)	0,06–0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14–21 (11)	sajaukt ar smiltīm vienādās proporcijās un mērcēt 500 vienībās glutaraldehīdā uz miljonu vienību šķīdinātāja 24 stundas (11), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4)	PĒC (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Pensilvānijas smaildadzis)	A lauki, klajas dzīvotnes (16)	25–61 (14, 29)		0(1) 5(29)		dīgšanu var inhibēt tumsa (1), mērcēt siltā ūdenī 12 stundas (29)	PIRMS un PĒC (31)	A	
Xanthium spinosum (dzeloņainais smaildadzis)	A klajas dzīvotnes (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		skarifikācija (14), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6)	PIRMS un PĒC (6)	A	
Xanthium strumarium (dziedzerainais smaildadzis)	A lauki, klajas dzīvotnes (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10–20 (6, 21)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 14, 21)	PIRMS un PĒC (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (pļavas ķērsa)	P lauki, ceļmalas, velēnas platības (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (18, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 22)	PĒC (5, 22)	F	

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (pļavas spulgnaglene)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	var būt nepieciešama nobriešana (18), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 15, 22–26)	PĒC (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (baltā balanda)	A laukmales, traucējumu skartas platības (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	apstrāde atšķiras atkarībā no sēklu krāsas (19), sausumā ir miera periods (19), dīgšanu inhibē tumsa (1, 18, 19), aukstā stratifikācija (18), nav īpašu apstrādes nosacījumu (14, 34)	PIRMS un PĒC (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (divšķautņu asinszāle)	P lauki, aramzeme, klajas dzīvotnes (16, 19)	0,1 –0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (1, 18, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 15, 25, 27)	PĒC (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (īvjlapu ipomeja)	A ceļmalas, klajas dzīvotnes, labības lauki (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	apstarošana neietekmē dīgšanu (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 21)	PIRMS un PĒC (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (apaļais dižmeldrs)	P aramzeme, ganības, ceļmalas (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	dīgšanu inhibē tumsa (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 10, 14)	PIRMS un PĒC (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (ragainais vanagnadziņš)	P zālainas platības, ceļmalas, klajas dzīvotnes (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikācija (14, 19), apstarošana neietekmē dīgšanu (18, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (23, 25)	PĒC (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
Senna obtusifolia (platlapu kasija, platlapu senna)	A mitri meži (16)	23–28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10–20 (6,9)		mērcēt sēklas ūdenī 24 stundas (9), skarifikācija (14), sēklu dzīvotspēja atšķiras atkarībā no krāsas (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6)	PĒC (6,9)	A	
Sesbania exaltata (kaņepju sebānija)	A aluviāla augsne (16)	11–13 (9, 14)	L > D (9)	10–20 (9, 21)		mērcēt sēklas ūdenī 24 stundas (9), apstarošana neietekmē dīgšanu (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (21)	PIRMS un PĒC (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (pļavas āboliņš)	P lauki, ceļmalas, aramzeme (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	skarifikācija (14, 18), var būt nepieciešama nobriešana (19), apstarošana neietekmē dīgšanu (1, 19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5)	PĒC (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (sirds mātere)	P klajumi (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14)	PĒC (4)	F	
Mentha spicata (krūzmētra)	P mitrāji (16)	2,21 (4)		0 (4)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (4)	PĒC (4)	F	
Nepeta cataria (īstā kaķumētra)	P traucējumu skartas platības (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (2, 4, 14)	PĒC (2,4)	F	

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
Prunella vulgaris (parastā brūngalvīte)	P aramlauki, zālainas platības, traucējumu skartas vietas (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (18, 19), lielākas sēklas dīgst labāk (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14, 22)	PĒC (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (ārstniecības pātaine)	P pļavas, laukmales (19)	14–18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 22)	PĒC (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Teofrasta virvene)	A lauki, klajas dzīvotnes (16)	8.8 (14)	L= D (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	skarifikācija (14), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 10, 21)	PIRMS un PĒC (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (dzeloņainā alteja)	A lauki, ceļmalas (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10–20 (6, 21)		skarifikācija (14), apstarošana neietekmē dīgšanu (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 21)	PIRMS un PĒC (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (zīda magone)	A lauki, aramzeme, traucējumu skartas vietas (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	aukstā stratifikācija un skarifikācija (1, 19, 32), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14, 29)	PĒC (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis,* (parastā smilga)	zālieni, ganības (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	dīgšanu inhibē tumsa (1, 17–19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (10)	PĒC (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (peļastīšu lapsaste)	A lauki, klajas dzīvotnes (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	skarifikācija (14), apstrādāt ar 101 mg/L KNO_3 (14), siltā stratifikācija (1), dīgšanu inhibē tumsa (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (34)	PIRMS un PĒC (28, 34)	A	32

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
Avena fatua (vēja auza)	A apstrādājamas platības, klajumi (16)	7–37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	skarifikācija (7, 32), dīgšanu inhibē tumsa (1) aukstā stratifikācija (1, 18), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 10, 14)	PIRMS un PĒC (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (īstā jumtauza)	A lauki, ceļmalas, aramzeme (16)	0,45–2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		nobriešanas periods (1, 7, 32), dīgšanu inhibē gaisma (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (14)	PIRMS un PĒC (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (parastā sekstaine)	P lauki, ceļmalas, klajumi (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	apstarošana neietekmē dīgšanu (19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (14, 29)	PĒC (5)	A	
Digitaria sanguinalis (asinssarkanā pasāre)	A lauki, velēnas platības, klajumi (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	skarifikācija, aukstā stratifikācija un nobriešana (1, 7, 14, 32), apstrādāt ar 101 mg/L KNO_3 (14), dīgšanu inhibē tumsa (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (21)	PIRMS un PĒC (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (parastā gaiļsāre)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10–20 (7, 21)		skarifikācija (7, 32), apstarošana neietekmē dīgšanu (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (3, 14, 21)	PIRMS un PĒC (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Kanādas savvaļas rudzi)	P upmalas, traucējumu skartas vietas (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14–28 (11)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (2, 11)	PĒC (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (pļavas auzene)	P lauki, mitrāji (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (10, 19)	PĒC (10)	A	7

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
Hordeum pusillum (pundurmiezis)	A ganības, ceļmalas, klajumi (16)	3,28 (14)				siltā stratifikācija (1), apstarošana neietekmē dīgšanu (1)	PIRMS (31)		7
Phieum pratense (pļavas timotiņš)	P ganības, aramlauki, traucējumu skartas vietas (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	dīgšanu inhibē tumsa (19), apstarošana neietekmē dīgšanu (17), nav īpašu apstrādes nosacījumu (10, 14, 17, 19)	PĒC (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (dārza vējgriķis)	A klajumi, ceļmalas (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0–2 (4, 29)		aukstā stratifikācija 4–8 nedēļas (1, 2, 4, 20, 29), apstarošana neietekmē dīgšanu (1)	PIRMS un PĒC 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (skābeņlapu sūrene)	A mitra augsne (16)	1,8–2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	apstarošana neietekmē dīgšanu (1), dīgšanu inhibē tumsa (18), aukstā stratifikācija (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5)	PIRMS un PĒC (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Pensilvānijas sūrene)	A lauki, klajumi (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		aukstā stratifikācija 4 nedēļas 0–5 °C temperatūrā (1, 29), dīgšanu inhibē tumsa (1)	PIRMS (31)	A, E	
Polygonum persicaria (blusu sūrene)	A traucējumu skartas platības, aramzeme (16, 19)	2,1 –2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	skarifikācija, aukstā stratifikācija, apstrāde ar glutaraldehīdu (14), aukstā stratifikācija, nobriešana (17–19), dīgšanu inhibē tumsa (19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (13)	PĒC (13)	A	32

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums (1) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas fotoperiods (2)	Augšanas dziļums (mm) (3)	Dīgšanas ilgums (dienas) (4)	Īpaša apstrāde (5)	Toksicitātes tests (6)	Sēklu piegādātāji (7)	Citas atsauces (8)
Rumex crispus (cirtainā skābene)	P aramlauki, ceļmalas, klajumi (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	dīgšanu inhibē tumsa (18, 19), var būt nepieciešama nobriešana (18), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 14, 33)	PĒC (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (tīruma pavirza)	A aramlauki, klajumi, traucējumu skartas vietas (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	aukstā stratifikācija, apstrāde ar glutaraldehīdu (1,14, 18, 19, 32), dīgšanai nepieciešama gaisma (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (2, 4)	PĒC (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (kodīgā gundega)	P aramlauki, ceļmalas, klajumi (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 22, 24–26)	PĒC (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (pilsētas bitene)	P dzīvžogi, mitrāji (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (18, 19), siltā stratifikācija (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 22, 25, 26)	PĒC (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (ķeraiņu madara)	A aramlauki, mitrāji, traucējumu skartas vietas (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	aukstā stratifikācija (1, 18, 19), apstarošana neietekmē dīgšanu (18, 19), gaisma inhibē dīgšanu (1), nav īpašu apstrādes nosacījumu (6, 14)	PIRMS un PĒC (6, 28)	A	32

▼M6

DZIMTA, sugas botāniskais nosaukums (vispārpieņemtais nosaukums latviešu valodā)	Dzīves ilgums ([1]) un dzīvotne	Sēklas svars (mg)	Dīgšanas vai augšanas foto-periods ([2])	Augšanas dziļums (mm) ([3])	Dīgšanas ilgums (dienas) ([4])	Īpaša apstrāde ([5])	Toksicitātes tests ([6])	Sēklu piegādātāji ([7])	Citas atsauces ([8])
Galium mollugo (mīkstā madara)	P dzīvžogu valņi, klajumi (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		nav īpašu apstrādes nosacījumu (5, 14, 22, 24, 26, 29)	PĒC (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (sarkanā uzpirkstīte)	B, P dzīvžogi, klajumi (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (1, 17–19), nav īpašu apstrādes nosacījumu (4, 22–26)	PĒC (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (Persijas veronika)	A aramlauki, klajumi, traucējumu skartas vietas (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	dīgšanu inhibē tumsa (18, 19), aukstā stratifikācija (18), nav īpašu apstrādes nosacījumu (14)	PIRMS un PĒC (28)	A	32

([1]) A = viengadīgs, B = divgadīgs, P = daudzgadīgs.
([2]) Atsauces 11, 14 un 33 attiecas uz gaismas (L) un tumsas (D) attiecību, kas nepieciešama dīgšanas ierosināšanai. Atsauces 3, 6, 9, 10, 13 un 20 attiecas uz augšanas apstākļiem siltumnīcās.
([3]) 30 mm norāda, ka sēklas tika iesētas augsnes virskārtā vai arī ka sēklu dīgšanai ir nepieciešama gaisma.
([4]) Norādītie skaitļi nozīmē dienu skaitu, kas nepieciešams, lai uzdīgtu attiecīgais sēklu procentuālais daudzums saskaņā ar sniegto atsauci, piemēram, 3 dienās (50 %) dīgšana (atsauce 19).
([5]) Nobriešanas un/vai stratifikācijas ilgums ne vienmēr ir pieejams. Ja neskaita aukstās apstrādes prasības, temperatūras apstākļi nav norādīti, jo siltumnīcas testos ir ierobežota temperatūras kontrole. Lielākā daļa sēklu uzdīgs normālu siltumnīcām raksturīgu temperatūras svārstību gadījumā.
([6]) Norāda, ka suga pirms uzdīgšanas (PIRMS) un/vai pēc uzdīgšanas (PĒC) tika izmantota herbicīdu toksicitātes testos.
([7]) Piemēram minēts viens vai vairāki komerciālo sēklu izplatītāji.
([8]) Norādītas divas alternatīvas izmantotās atsauces.

▼**M6**

Sēklu piegādātāji

Piegādātāja ID	Informācija par piegādātāju
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 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 CANADA (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 ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan *P.O.* *Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA* (800) 274–7333 www.thompson-morgan.com

ATSAUCES

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & 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., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & 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., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & 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. pp. 151 – 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & 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 Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & 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. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(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. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

4. papildinājums

Noteiktām kultūraugu sugām piemērotu augšanas apstākļu piemēri

Ir noskaidrots, ka turpmāk minētie apstākļi ir piemēroti 10 kultūraugu sugām un tos var izmantot kā orientierus arī testiem augšanas kamerās, kuros izmanto dažas citas sugas:

oglekļa dioksīda koncentrācija: 350 ± 50 daļiņas uz miljonu;

relatīvais gaisa mitrums: 70 ± 5 % gaišajos periodos 90 ± 5 % tumšajos periodos;

temperatūra: 25 ± 3 °C dienā, 20 ± 3 °C naktī;

fotoperiods: 16 stundas gaismā/8 stundas tumsā, pieņemot, ka vidējais viļņu garums ir no 400 līdz 700 nm;

gaismas spilgtums – 350 ± 50 μE/m^2/s, mērot lapotnes augšā.

Kultūraugu sugas:

— parastais tomāts *(Solanum lycopersicon)*;

— lauka gurķis *(Cucumis sativus)*;

— dārza salāti *(Lactuca sativa)*;

— soja *(Glycine max)*;

— galviņkāposts *(Brassica oleracea var. capitata)*;

— savvaļas burkāns *(Daucus carota)*;

— sējas auza (*Avena sativa*);

— daudzgadīgā airene *(Lolium perenne)*;

— parastā kukurūza *(Zea mays)*;

— dārza sīpols *(Allium cepa)*.

▼M6

C.32. SĪKSLIEKU VAIROŠANĀS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 220 (2004. gads). Tā ir izveidota, lai izvērtētu ķīmisko vielu ietekmi uz sīkslieku *Enchytraeus albidus (Henle, 1873)* vairošanos augsnē. Tā galvenokārt balstīta uz metodi, ko izstrādāja Vācijas Federatīvā vides pārvalde (1) un kas ir pārbaudīta starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (2). Tika apsvērtas arī citas testēšanas metodes, ar kurām testēt ķīmisko vielu toksicitāti sīksliekām *(Enchytraeidae)* un sliekām (3)(4)(5)(6)(7)(8).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

2. Augsnē mītošie sīkslieku *(Enchytraeus)* ģints posmtārpi ir ekoloģiski piemērotas sugas ekotoksikoloģiskajai testēšanai. Lai gan sīksliekas bieži vien ir sastopamas augsnēs, kur mīt sliekas, ir arī tiesa, ka tās bieži lielā daudzumā sastopamas augsnēs, kur slieku nav. Sīksliekas var izmantot laboratorijas testos, kā arī lauka un jauktajos pētījumos. No praktiskā viedokļa daudzas sīkslieku sugas ir viegli kopt un audzēt, un to vairošanās laiks ir ievērojami īsāks nekā sliekām. Tādēļ vairošanās testa ilgums sīkslieku gadījumā ir tikai 4–6 nedēļas, turpretī Kalifornijas sarkano hibrīdslieku *(Eisenia fetida)* gadījumā tas ir astoņas nedēļas.

3. Pamatinformāciju par sīkslieku ekoloģiju un ekotoksikoloģiju zemes vidē var atrast (9)(10)(11)(12).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

4. Pieaugušas sīksliekas pakļauj virknei testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, kas tiek iejaukta mākslīgā augsnē. Testu var iedalīt divos posmos: a) diapazona noteikšanas tests, ja nav pieejama pietiekama informācija; tajā mirstība ir galvenais beigupunkts, ko izvērtē pēc divu nedēļu ekspozīcijas, un b) galīgais vairošanās tests, kurā izvērtē kopējo jauno īpatņu un izdzīvojušo vecāku skaitu. Galīgā testa ilgums ir sešas nedēļas. Pēc pirmajām trīs nedēļām pieaugušos tārpus aizvāc un reģistrē morfoloģiskās izmaiņas. Pēc nākamajām trīs nedēļām saskaita no vecāku producētajiem kokoniem izšķīlušos pēcnācējus. Testējamai ķīmiskajai vielai eksponēto dzīvnieku vairošanās rādītājs tiek salīdzināts ar kontrolgrupu vairošanās rādītāju, lai noteiktu i) nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)* un/vai ii) EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}), ar regresijas modeli aplēšot koncentrāciju, kas izraisītu vairošanās rādītāja samazināšanos par x %. Testējamām koncentrācijām būtu jāaptver EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}), lai EC_x tiktu interpolēts, nevis ekstrapolēts.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

5. Vēlams zināt testējamās ķīmiskās vielas šķīdību ūdenī (log K_{ow}), augsnes ūdens sadalījuma koeficientu (piemēram, šā pielikuma C.18 vai C.19. nodaļā) un tvaika spiedienu. Ir vēlama papildu informācija par testējamās ķīmiskās vielas apriti augsnē, piemēram, fotolīzes un hidrolīzes rādītāju.

6. Šo testa metodi var izmantot ūdenī šķīstošām un nešķīstošām ķīmiskajām vielām. Tomēr attiecīgi atšķirsies arī testējamās ķīmiskās vielas lietošanas veids. Šī testēšanas metode nav izmantojama nedz gaistošām ķīmiskajām vielām, t. i., ķīmiskajām vielām, kurām Henrija konstante vai gaisa/ūdens sadalījuma koeficients ir lielāks nekā viens, nedz arī ķīmiskajām vielām, kuru tvaika spiediens pārsniedz 0,0133 Pa 25 °C temperatūrā.

▼M6

TESTA DERĪGUMS

7. Lai tests būtu derīgs, kontrolparaugos tam jāatbilst šādiem izpildes kritērijiem:

— pieaugušo indivīdu mirstība nedrīkst pārsniegt 20 % diapazona noteikšanas testa beigās un pēc pirmajām trīs vairošanās testa nedēļām;

— pieņemot, ka testa sākumā uz vienu trauku tika izmantoti 10 pieaugušie indivīdi, testa beigās uz vienu trauku jābūt izšķīlušamies vidēji vismaz 25 jaunajiem īpatņiem;

— vidējā jauno īpatņu skaita variācijas koeficients nedrīkst pārsniegt 50 % vairošanās testa beigās.

Ja tests neatbilst iepriekš minētajiem derīguma kritērijiem, tas jāizbeidz, ja vien nav pamatot testa turpināšanu. Pamatojums būtu jāiekļauj testēšanas pārskatā.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

8. Ķīmiskā standartviela ir vai nu jātestē regulāros intervālos, vai, iespējams, jāiekļauj katrā testā, lai pārliecinātos, ka testējamo organismu reakcija laika gaitā nav būtiski mainījusies. Piemērota ķīmiskā standartviela ir karbendazīms, kam ir pierādīta ietekme uz sīkslieku izdzīvošanu un vairošanos (13)(14), vai arī var izmantot citas ķīmiskās vielas ar labi izpētītiem toksicitātes datiem. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā izmantoja karbendazīma preparātu, kas pazīstams ar komercnosaukumu *Derosal™*, ko piegādā *AgrEvo Company* (Frankfurte, Vācija) un kas satur 360 g /l (32,18 %) aktīvās vielas (2). Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā noteiktā vairošanās EC_{50} bija diapazonā 1,2 ± 0,8 mg aktīvās vielas (AV)/kg sausmasas (2). Ja testa sērijā iekļauj pozitīvu toksisko standartu, izmanto vienu koncentrāciju un replikātu skaitam jābūt tādam pašam kā kontrolgrupas paraugu skaitam. Karbendazīma gadījumā ir ieteicamā testējamā koncentrācija ir 1,2 mg AV/kg sausmasas (karbendazīmu testējot kā šķidru preparātu).

TESTA APRAKSTS

Aparatūra

9. Testēšanas traukiem jābūt izgatavotiem no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Piemērotas ir stikla burkas (piemēram, ar tilpumu 0,20–0,25 litri un diametru ≈ 6 cm). Traukiem jābūt ar caurspīdīgiem vākiem (piemēram, no stikla vai polietilēna), kas ir izveidoti tā, lai samazinātu ūdens iztvaikošanu, vienlaikus atļaujot gāzu apmaiņu starp augsni un atmosfēru. Vākiem jābūt caurspīdīgiem, lai gaisma varētu izkļūt cauri.

10. Nepieciešams laboratorijas standartaprīkojums, jo īpaši:

— žāvēšanas skapis;

— stereomikroskops;

— pH-metrs un fotometrs;

— piemēroti, precīzi svari;

— piemērota temperatūras kontroles ierīce,

— piemērota mitruma kontroles ierīce (nav vajadzīga, ja ekspozīcijas traukiem ir vāki);

— inkubators vai maza telpa ar gaisa kondicionētāju;

— pincetes, āķi vai cilpas;

— gaismas baseins.

Mākslīgās augsnes sagatavošana

11. Šajā testā (5)(7) izmanto mākslīgo augsni ar šādu sastāvu (pamatojoties uz saussvariem, kas žāvēti līdz konstantam svaram 105 °C temperatūrā):

▼**M6**

— 10 % gaisā žāvētas un smalki samaltas sfagnu kūdras (ir pieņemams daļiņu izmērs 2 ± 1 mm); pirms to izmanto testā, ieteicams pārbaudīt, vai augsne, kas sagatavota ar svaigu kūdras paraugu, ir piemērota tārpu audzēšanai;

— 20 % kaolīna mālu (kaolinīta saturam vēlams būt virs 30 %);

— apmēram 0,3 līdz 1,0 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$, pulverizēta, analītiskās tīrības pakāpes), lai iegūtu pH 6,0 ± 0,5; pievienojamā kalcija karbonāta daudzums galvenokārt atkarīgs no kūdras kvalitātes/veida;

— apmēram 70 % gaisā žāvētu kvarca smilšu (atkarībā no nepieciešamā $CaCO_3$ daudzuma), lielākoties smalku smilšu, kas vairāk nekā par 50 % sastāv no daļiņām ar izmēru 50 līdz 200 mikroni.

Pirms izmantot augsni galīgajā testā, ir ieteicams pierādīt mākslīgās augsnes piemērotību tārpu audzēšanai un testa derīguma kritēriju izpildei. Ir īpaši ieteicams veikt šādu pārbaudi, lai pārliecinātos, ka testa izpilde nav traucēta, ja organiskā oglekļa saturs mākslīgajā augsnē ir samazināts, piemēram, samazinot kūdras saturu līdz 4–5 % un attiecīgi palielinot smilšu saturu. Šādi samazinot organiskā oglekļa saturu, var samazināties testējamās ķīmiskās vielas iespēja adsorbēties augsnē (organiskajā ogleklī) un palielināties testējamās ķīmiskās vielas pieejamība tārpiem. Ir pierādīts, ka *Enchytraeus albidus* var atbilst vairošanās derīguma kritērijiem, ja tās testē lauka augsnēs ar zemāku organiskā oglekļa saturu, nekā minēts iepriekš (piemēram, 2,7 %) (15), un ir gūta pieredze – lai gan ierobežota – ka to var panākt arī ar mākslīgu augsni, kas satur 5 % kūdras.

Piezīme: izmantojot dabisko augsni papildu (piemēram, augstāka līmeņa) testēšanā, arī ir jāpierāda augsnes piemērotība un testa derīguma kritēriju izpilde.

12. Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi samaisa (piemēram, liela izmēra laboratorijas maisītājā). Tas jādara vismaz vienu nedēļu pirms testa sākšanas. Samaisītā augsne divas dienas jāuzglabā, lai līdzsvarotu/stabilizētu skābumu. pH noteikšanā izmanto augsnes un 1 M kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma maisījumu attiecībā 1:5 (sk. (16) un 3. papildinājumu). Ja augsnes skābums pārsniedz vajadzīgo diapazonu (sk. 11. punktu), to var pielāgot, pievienojot atbilstošu daudzumu $CaCO_3$. Ja augsne ir pārāk sārmaina, to var koriģēt, pievienojot vairāk maisījuma, kas minēts 11. punktā, bet izlaižot $CaCO_3$.

13. Mākslīgās augsnes maksimālo ūdensnoturspēju *(WHC)* nosaka saskaņā ar 2. papildinājumā aprakstītajām procedūrām. Vienu vai divas dienas pirms testa sākšanas sauso mākslīgo augsni iepriekš samitrina, pievienojot pietiekami daudz dejonizēta ūdens, lai iegūtu apmēram pusi galīgā ūdens satura, kas ir 40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas. Testa sākumā iepriekš samitrinātā augsne tiek sadalīta daļās atbilstoši testējamo koncentrāciju (un attiecīgā gadījumā ķīmiskās standartvielas) un kontrolgrupas paraugu skaitam.

▼M6

Mitruma saturu pielāgo 40–60 % maksimālās *WHC*, pievienojot testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu un/vai destilētu vai dejonizētu ūdeni (sk. 19.–21. punktu). Mitruma saturu nosaka testa sākumā un beigās (izžāvējot līdz konstantam svaram 105 °C temperatūrā), un tam jābūt tārpu izdzīvošanai optimālajā intervālā. Augsnes mitruma saturu var aptuveni pārbaudīt, maigi saspiežot augsni rokās; ja mitruma saturs ir atbilstošs, starp pirkstiem jāparādās sīkiem ūdens pilieniem.

Testējamo dzīvnieku izvēle un sagatavošana

14. Ieteicamās testēšanas sugas ir *Enchytraeus albidus* (*Henle,* 1837), *Enchytraeidae* dzimtas pārstāve (*Oligochaeta* kārta, *Annelida* tips). *Enchytraeus albidus* ir viena no lielākajām sīkslieku sugām – ir reģistrēti īpatņi garumā līdz 35 mm (17)(18). *E. albidus* ir izplatīta visā pasaulē un ir sastopama jūras, saldūdens un sauszemes vidēs, galvenokārt trūdošā organiskajā materiālā (jūraszālēs, kompostā) un reti pļavās (9). Tās lielā ekoloģiskā tolerance un dažas morfoloģiskās variācijas var liecināt par to, ka pastāv dažādas rases.

15. *E. albidus* ir komerciāli pieejama kā zivju barība. Ir jāpārbauda, vai kultūra nav kontaminēta ar citu kultūru, parasti ar mazākām sugām (1) (19). Ja rodas kontaminācija, visi tārpi ir jānomazgā ar ūdeni Petri platē. Tad ir jāizvēlas pieauguši *E. albidus* īpatņi (izmantojot stereomikroskopu), lai aizsāktu jaunu kultūru, bet pārējos tārpus nelieto. *E. albidus* var viegli audzēt plašā klāstā dažādu organisko materiālu (sk. 4. papildinājumu). *E. albidus* dzīves cikls ir īss, jo briedums tiek sasniegts laikā no 33. (18 °C) līdz 74. dienai (12 °C) (1). Testēšanai var tikt izmantotas tikai tās kultūras, kas laboratorijā vismaz piecas nedēļas (vienu paaudzi) uzglabātas bez problēmām.

16. Arī citas sīkslieku (*Enchytraeus)* ģints sugas ir piemērotas, piemēram, *E. buchholzi* (*Vejdovsky,* 1879) vai *E. crypticus (Westheide & Graefe, 1992)* (sk. 5. papildinājumu). Ja izmanto citas sīkslieku sugas, tās ir skaidri jāidentificē un pārskatā jāsniedz pamatojums, kādēļ izraudzīta šī suga.

17. Testos izmantojamie dzīvnieki ir pieauguši tārpi. Tiem jābūt oliņām (baltiem plankumiem) jostiņas rajonā un jābūt aptuveni vienāda izmēra (apmēram 1 cm gariem). Pavairošanas kultūras sinhronizācija nav nepieciešama.

18. Ja sīksliekas neaudzē viena un tā paša veida augsnē un apstākļos (ieskaitot barošanas apstākļus), ko izmantos galīgajā testā, tās vismaz 24 stundas līdz 3 dienas jāaklimatizē. Pieaugušo indivīdu skaits, kas ir lielāks nekā nepieciešams testa veikšanai, sākumā jāaklimatizē, lai būtu iespēja noraidīt bojātus vai citādi nepiemērotus īpatņus. Aklimatizācijas perioda beigās testam izvēlas tikai tārpus, kuriem ir oliņas un kuri neizrāda uzvedības anomālijas (piemēram, nemēģina izkļūt no augsnes). Tārpus uzmanīgi izvāc ar juveliera pinceti, āķiem vai cilpām un novieto uz Petri plates ar nelielu daudzumu svaiga ūdens. Šim nolūkam vislabāk izmantot rekonstituētu svaigu ūdeni atbilstoši šā pielikuma C.20. nodaļai *(Daphnia magna* vairošanās tests), jo dejonizēts, demineralizēts vai krāna ūdens var būt tārpiem kaitīgs. Tārpus pārbauda ar stereomikroskopu un nelieto tos, kuriem nav oliņu. Rūpīgi aizvāc visas ērces vai lēcastes, kas varētu būt inficējušas kultūras. Veselīgos tārpus, ko neizmanto testā, novieto atpakaļ izejkultūrā.

▼M6

Testējamo koncentrāciju sagatavošana

Ūdenī šķīstoša testējamā ķīmiskā viela

19. Pagatavo testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu dejonizētā ūdenī daudzumā, kas ir pietiekams visiem vienas testējamās koncentrācijas replikātiem. Ieteicams izmantot atbilstošu ūdens daudzumu, lai panāktu nepieciešamo mitruma saturu, t. i., 40–60 % maksimālās ūdensnoturspējas *WHC* (sk. 13. punktu). Katru testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu pirms iemaisīšanas testēšanas traukā rūpīgi sajauc ar vienu paraugu iepriekš samitrinātas augsnes.

Ūdenī nešķīstoša testējamā ķīmiskā viela

20. Ja ķīmiskā viela nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskajos šķīdinātājos, testējamo ķīmisko vielu var izšķīdināt mazākajā iespējamā piemērotas nesējvielas (piemēram, acetona) tilpumā. Jāizmanto tikai gaistoši šķīdinātāji. Nesējvielu izsmidzina vai iejauc nelielā daudzumā (piemēram, 2,5 g) smalku kvarca smilšu. No nesējvielas atbrīvojas, to vienu stundu iztvaicējot velkmes skapī. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātajai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstošu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu nepieciešamo mitruma saturu. Galīgo maisījumu sadala pa testēšanas traukiem.

21. Ja ķīmiskā viela vāji šķīst ūdenī un organiskajos šķīdinātājos, 2,5 g smalki samaltu kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku samaisa ar tādu testējamās ķīmiskās vielas daudzumu, ar kuru var iegūt vēlamo testēšanas koncentrāciju. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātajai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstošu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu nepieciešamo mitruma saturu. Galīgo maisījumu sadala pa testēšanas traukiem. Procedūru atkārto katrai testējamajai koncentrācijai un sagatavo arī atbilstošus kontrolparaugus.

22. Parasti ķīmiskās vielas netestē koncentrācijās, kas pārsniedz 1 000 mg/kg augsnes sausmasas. Tomēr testēšana augstākās koncentrācijās var būt nepieciešama sakaņā ar konkrēta testa mērķiem.

TESTĒŠANAS NORISE

Testa grupas un kontrolgrupas

23. Katras testējamās koncentrācijas gadījumā testēšanas traukā ievieto testējamās augsnes daudzumu, kas atbilst 20 g saussvara (sk. 19.–21. punktu). Sagatavo arī kontrolgrupas paraugus bez testējamās ķīmiskās vielas. Katram traukam pievieno barību atbilstoši 29. punktā aprakstītajai procedūrai. Katram testēšanas traukam pēc nejaušības principa iedala desmit tārpus. Tārpus rūpīgi pārvieto uz katru trauku un novieto uz augsnes virsas, izmantojot, piemēram, juveliera pinceti, āķus vai cilpas. Testējamo koncentrāciju un kontrolgrupas replikātu skaits ir atkarīgs no izmantotā testēšanas plāna (sk. 34. punktu). Testēšanas traukus pēc nejaušības principa izvieto testēšanas inkubatorā, un ik nedēļu tos pēc nejaušības principa pārkārto.

24. Ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu, papildus testa sērijai ir jāsagatavo viena kontrolsērija ar kvarca smiltīm, kas apsmidzinātas vai sajauktas ar šo šķīdinātāju. Šķīdinātāja vai disperģētājvielas koncentrācijai jābūt tādai pašai, kādu izmanto testēšanas traukos ar testējamo ķīmisko vielu. Ja ķīmiskā viela jāievada saskaņā ar 21. punktā aprakstītajām procedūrām, ir jānodrošina kontrolsērija ar papildu kvarca smilšu daudzumu (2,5 g uz trauku).

▼M6

Testēšanas apstākļi

25. Testēšanas temperatūra ir 20 ± 2 °C. Lai atturētu tārpus no līšanas ārā no augsnes, testu veic kontrolētos gaismas un tumsas ciklos (vēlams – 16 stundas gaismas un 8 stundas tumsas) pie 400 līdz 800 luksu apgaismojuma testēšanas trauku rajonā.

26. Lai pārbaudītu augsnes mitrumu, traukus testēšanas sākumā un turpmāk reizi nedēļā nosver. Svara zudumu kompensē, pievienojot atbilstošu daudzumu dejonizēta ūdens. Jāpiebilst, ka ūdens zudumu var samazināt, uzturot augstu gaisa mitrumu (>80 %) testēšanas inkubatorā.

27. Mitruma saturs un pH jāmēra gan diapazona noteikšanas, gan galīgā testa sākumā un beigās. Mērījumi jāveic kontrolgrupas un apstrādātajos (visu koncentrāciju) augsnes paraugos, kas sagatavoti un uzturēti tādā pašā veidā kā testa kultūras, bet nesatur tārpus. Barība šiem augsnes paraugiem būtu jāpievieno tikai testēšanas sākumā, lai veicinātu mikrobu aktivitāti. Pievienotās barības daudzumam jābūt tādam pašam kā testējamajām kultūrām pievienotajam. Testēšanas laikā šiem traukiem nav nepieciešams pievienot papildu barību.

Barošana

28. Var izmantot barību, kas spēj uzturēt sīkslieku populāciju. Ir konstatēts, ka piemērots barības materiāls ir auzu pārslas – vēlams, iepriekš autoklavētas, lai izvairītos no mikrobioloģiskās kontaminācijas (piemērota ir arī karsēšana).

29. Pirms tārpu ievietošanas katrā traukā vispirms augsnē iemaisa barību (50 mg samaltu auzu pārslu). Turpmāk barību pievieno ik nedēļu līdz 21. dienai. 28. dienā barošanu neveic, jo pieaugušie indivīdi šajā posmā ir aizvākti, bet jaunajiem tārpiem turpmāk ir vajadzīgs salīdzinoši maz papildu barības. Testēšanas laikā barošana nozīmē 25 mg samaltu auzu pārslu uz trauku, ko rūpīgi uzber uz augsnes virskārtas, lai izvairītos no tārpu savainošanas. Lai samazinātu sēnīšu augšanu, auzu pārslas būtu jāaprok augsnē, apsedzot ar nelielu daudzumu augsnes. Ja barība netiek apēsta, būtu jāsamazina barības porcija.

Diapazona noteikšanas testa plāns

30. Kad nepieciešams, diapazona noteikšanas testu veic, piemēram, ar piecām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām – 0,1, 1,0, 10, 100 un 1 000 mg/kg (augsnes saussvara). Viens replikāts katrai apstrādei un kontrolgrupai ir pietiekami.

31. Diapazona noteikšanas testa ilgums ir divas nedēļas. Testa beigās izvērtē tārpu mirstību. Tārpu reģistrē kā beigtu, ja tas nereaģē uz mehānisko kairinājumu priekšējā galā. Papildu informācija par mirstību var noderēt, arī izlemjot par koncentrāciju intervālu galīgajam testam. Tādēļ vajadzētu reģistrēt arī izmaiņas pieaugušo uzvedībā (piemēram, nespēju ierakties augsnē; gulēšanu nekustīgā stāvoklī pret testēšanas trauka stikla sienu) un morfoloģijā (piemēram, atvērtu brūču klātbūtni), kā arī jauno īpatņu klātbūtni. Pēdējo rādītāju var noteikt ar 6. papildinājumā aprakstīto iekrāsošanas metodi.

32. LC_{50} var aptuveni noteikt, aprēķinot mirstības datu ģeometrisko vidējo. Nosakot koncentrāciju intervālu galīgajam testam, pieņem, ka ietekme uz vairošanos ir līdz pat 10 reizes zemāka nekā LC_{50}. Tomēr tā ir empīriska

▼M6

sakarība, katrā konkrētā gadījumā tā var atšķirties. Papildu novērojumi diapazona noteikšanas testā, piemēram, jauno īpatņu klātbūtne, var palīdzēt precizēt testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju intervālu, ko izmantot galīgajā testā.

33. Lai pareizi noteiktu LC_{50}, ieteicams veikt testu, izmantojot vismaz četrus katras testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas replikātus un adekvātu skaitu koncentrāciju, lai pie minētajām koncentrācijām iegūtu vismaz četras atbildreakcijas vidējās vērtības, kuru starpība būs statistiski nozīmīga. Attiecīgos gadījumos izmanto arī līdzīgu skaitu kontrolgrupu koncentrāciju un replikātu.

Galīgā vairošanās testa plāns

34. Pamatojoties uz starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rekomendācijām (2), var piedāvāt trīs testa plānus.

— *NOEC* noteikšanai būtu testē vismaz piecas koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 1,8 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

— EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}), noteikšanai būtu jātestē vismaz piecas koncentrācijas, un tām būtu jāaptver EC_x, lai EC_x varētu interpolēt, nevis ekstrapolēt. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami vismaz četri replikāti, kā arī vēl četri kontrolreplikāti. Kvocients var atšķirties, t. i., būt mazāks vai vienāds ar 1,8 paredzamajā ietekmes diapazonā un lielāks nekā 1,8 augstākām vai zemākām koncentrācijām.

— Kombinēta pieeja ļauj noteikt gan *NOEC*, gan EC_x. Būtu jāizmanto astoņas apstrādes koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai apstrādei ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 1,8 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

35. Jāizmanto desmit pieauguši tārpi uz testēšanas trauku (sk. 23. punktu). Barību testēšanas traukam pievieno testēšanas sākumā un turpmāk reizi nedēļā (sk. 29. punktu) līdz 21. dienai ieskaitot. 21. dienā augsnes paraugus rūpīgi pārmeklē ar rokām, novēro un saskaita dzīvos pieaugušos tārpus un pieraksta izmaiņas uzvedībā (piemēram, nespēja ierakties augsnē; nekustīga gulēšana pret testēšanas trauka stikla sienu) un morfoloģijā (piemēram, atvērtas brūces). Tad visi pieaugušie tārpi tiek aizvākti no testēšanas traukiem un testēšanas augsnes. Testēšanas augsni, kas satur producētos kokonus, inkubē trīs papildu nedēļas tajos pašos testēšanas apstākļos, izņemot to, ka barošana notiek tikai 35. dienā (t. i., 25 mg samaltu auzu pārslu uz trauku).

36. Pēc trīs nedēļām saskaita jaunos izšķīlušos tārpus. Ieteicamā metode balstās uz iekrāsošanu ar bengāļu sarkano (sk. 6. papildinājumu), lai gan piemērotas ir arī citas mitrās (bet ne karstās) ekstrakcijas un flotācijas tehnikas sk. 6. papildinājumu) (4)(10)(11)(20). Iekrāsošana ar bengāļu sarkano ir ieteicama tāpēc, ka suspendēto māla daļiņu radītās duļķes var traucēt augsnes substrāta mitrajai ekstrakcijai.

Robežtests

37. Ja diapazona noteikšanas testā pie augstākās koncentrācijas (t. i., 1 000 mg/kg) nenovēro nekādu ietekmi, vairošanās testu var veikt kā robežtestu, izmantojot 1 000 mg/kg, lai pierādītu, ka vairošanās *NOEC* ir lielāka nekā šī vērtība.

▼M6

Testa kopsavilkums un grafiks

38. Testēšanas posmus var rezumēt šādi:

Laiks	Diapazona noteikšanas tests	Galīgais tests
– 7. diena vai agrāk	— Sagatavojiet mākslīgo augsni (sauso sastāvdaļu samaisīšana)	— Sagatavojiet mākslīgo augsni (sauso sastāvdaļu samaisīšana)
– 5. diena	— Pārbaudiet mākslīgās augsnes pH — Izmēriet augsnes maksimālo *WHC*	— Pārbaudiet mākslīgās augsnes pH — Izmēriet augsnes maksimālo *WHC*
– 5. līdz – 3. diena	— Sašķirojiet tārpus aklimatizācijai	— Sašķirojiet tārpus aklimatizācijai
– 3. līdz 0. diena	— Aklimatizējiet tārpus vismaz 24 stundas	— Aklimatizējiet tārpus vismaz 24 stundas
– 1. diena	— Iepriekš samitriniet mākslīgo augsni un sadaliet pa partijām	— Iepriekš samitriniet mākslīgo augsni un sadaliet pa partijām
0. diena	— Sagatavojiet izejšķīdumus — Ievadiet testējamo ķīmisko vielu — Iesveriet testa substrātu testēšanas traukos — Iemaisiet barību — Ievietojiet tārpus — Izmēriet augsnes pH un mitruma saturu	— Sagatavojiet izejšķīdumus — Pievienojiet Ievadiet ķīmisko vielu — Iesveriet testa substrātu testēšanas traukos — Iemaisiet barību — Ievietojiet tārpus — Izmēriet augsnes pH un mitruma saturu
7. diena	— Pārbaudiet augsnes mitruma saturu	— Pārbaudiet augsnes mitruma saturu — Barojiet
14. diena	— Nosakiet pieaugušo īpatņu mirstību — Aplēsiet jauno īpatņu skaitu — Izmēriet augsnes pH un mitruma saturu	— Pārbaudiet augsnes mitruma saturu — Barojiet
21. diena		— Novērojiet pieaugušo īpatņu uzvedību — Aizvāciet pieaugušos īpatņus — Nosakiet pieaugušo īpatņu mirstību — Pārbaudiet augsnes mitruma saturu — Barojiet
28. diena		— Pārbaudiet augsnes mitruma saturu — Nebarojiet
35. diena		— Pārbaudiet augsnes mitruma saturu — Barojiet
42. diena		— Saskaitiet jaunos tārpus — Izmēriet augsnes pH un mitruma saturu

▼M6

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

39. Lai gan 7. papildinājumā ir sniegts īss apskats, šai testēšanas metodei nav galīgu statistisku norādījumu par testa rezultātu analizēšanu.

40. Diapazona noteikšanas testā galvenais beigupunkts ir mirstība. Vajadzētu reģistrēt arī izmaiņas pieaugušo īpatņu uzvedībā (piemēram, nespēju ierakties augsnē, gulēšanu nekustīgā stāvoklī pret testēšanas trauka stikla sienu) un morfoloģijā (piemēram, atvērtas brūces), kā arī jauno īpatņu klātbūtni. Lai noteiktu LC_{50}, parasti būtu jālieto probita analīze (21) vai logistiskā regresija. Tomēr gadījumos, kad šī analīzes metode nav piemērota (piemēram, ja ir pieejamas mazāk nekā trīs daļēji nāvējošas koncentrācijas), var izmantot alternatīvas metodes. Šīs metodes var būt slīdošie vidējie (22), saīsinātā Spīrmena–Kerbera metode *[Spearman-Karber method]* (23) vai vienkārša interpolācija (piemēram, LC_0 un LC_{100} ģeometriskais vidējais, ko aprēķina, izvelkot kvadrātsakni no LC_0 un LC_{100} reizinājuma).

41. Galīgajā testā beigupunkts ir vaislība (t. i., radušos jauno īpatņu skaits). Tomēr, tāpat kā diapazona noteikšanas testā, galīgajā pārskatā ir jāiekļauj arī visas kaitējuma pazīmes. Statistiskajai analīzei jāaprēķina vairošanās aritmētiskais vidējais un standartnovirze katrai apstrādes un kontroles grupai.

42. Ja ir veikta dispersijas analīze, standartnovirzi *(s)* un brīvības pakāpes *(df)* var aizstāt ar summārās dispersijas aplēsi, kas iegūta attiecīgi no *ANOVA* un tās brīvības pakāpēm, ar nosacījumu, ka dispersija nav atkarīga no koncentrācijas. Šajā gadījumā izmantojiet atsevišķās kontroles un apstrādes dispersijas. Šīs vērtības parasti aprēķina ar komerciālu statistikas programmu, par replikātiem izmantojot katra trauka rezultātus. Ja negatīvo un šķīdinātāja kontroļu datu apkopošana šķiet saprātīgāka nekā testēšana, salīdzinot ar vienu no tām, tās būtu jātestē, lai pārliecinātos, ka tās nav būtiski atšķirīgas (piemērotus testus sk. 45. punktā un 7. papildinājumā).

43. Papildu statistiskā testēšana un slēdziens ir atkarīgs no tā, vai replikātu vērtības atbilst normālsadalījumam un to dispersija ir homogēna.

***NOEC* noteikšana**

44. Priekšroka ir jaudīgu testu lietošanai. Būtu jāizmanto informācija, piemēram, no iepriekšējās pieredzes ar starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu vai citiem vēsturiskiem datiem, par to, vai dati ir aptuveni normāli sadalīti. Būtiskāka ir dispersijas homogenitāte (homoskedastiskums). Pieredze liecina, ka nereti dispersija palielinās, palielinoties vidējām vērtībām. Tādos gadījumos homoskedastiskumu var panākt ar datu transformāciju. Tomēr šādai transformācijai būtu jābalstās uz pieredzi ar vēsturiskiem datiem, nevis pētāmajiem datiem. Homogēnu datu gadījumā būtu jāveic vairāki t-testi, piemēram, Viljamsa tests *(Williams' test)* ($\alpha = 0{,}05$, vienpusējais) (24)(25) vai dažos gadījumos – Daneta tests *(Dunnett's test)* (26)(27). Jānorāda, ka nevienlīdzīgas replikācijas gadījumā, tabulas t vērtības jāizlabo atbilstoši Daneta un Viljamsa ieteikumiem. Reizēm atbildreakcijas nepalielinās/nesamazinās regulāri, jo ir plaša variācija. Tādā gadījumā – ja ir izteikta novirze no

▼M6

monotonitātes – piemērotāks ir Daneta tests. Ja ir novirzes no homoskedastiskuma, var būt pamatoti uzmanīgāk izmeklēt iespējamo ietekmi uz dispersijām, lai varētu izlemt, vai t-testus var izmantot bez būtiskiem jaudas zudumiem (28). Alternatīvi var izmantot multiplu U-testu, piemēram, Bonferoni U-testu *(Bonferroni U-test)* saskaņā ar Holmu (29), vai, ja šie dati ir heteroskedastiski, bet citādi ir atbilst pamatā esošai monotonai devas atbildreakcijai, citu neparametrisku testu, piemēram, Džonkhīra–Terpstras testu *(Jonckheere-Terpstra)* (30)(31) vai Šērlija testu *(Shirley test)* (32)(33); kopumā tie būtu vēlamāki nekā nelīdzvērtīgās dispersijas t-testi (sk. arī shēmu 7. papildinājumā).

45. Ja ir veikts robežtests un izpildās parametriskās testēšanas procedūras priekšnosacījumi (normālsadalījums, homogenitāte), var izmantot pāru Stjūdenta t-testu *(Student t-test)*, ja ne – Manna–Vitnija U-testa procedūru *(Mann-Whitney U-test)* (29).

EC_x noteikšana

46. Lai aprēķinātu EC_x vērtību, lineārās vai nelineārās regresijas analīzē izmanto katras apstrādes vidējās vērtības pēc tam, kad ir iegūta atbilstoša devas–atbildreakcijas funkcija. Attiecībā uz tārpu augšanu kā nepārtrauktu atbildreakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot piemērotu regresijas analīzi (35). Kā piemērotas funkcijas bināriem datiem (mirstībai/izdzīvošanai un pēcnācēju skaitam) minamas normālā sigmoīda, logistiskā vai Veibula *(Weibull)* funkcija, kas satur divus līdz četrus parametrus, no kuriem daži var modelēt arī hormētiskas atbildreakcijas. Ja devas–atbildreakcijas funkcija piemeklēta ar lineāras regresijas analīzi, ar regresijas analīzi būtu jākonstatē būtisks r^2 (determinācijas koeficients) un/vai virziena koeficients, pirms nosaka EC_x,, regresijas analīzē atrastajā vienādojumā ievietojot vērtību, kas atbilst x % kontroles vidējā. 95 % ticamības intervālu aprēķina pēc Fīlera *(Fieller)* (citēts Finneja *(Finney)* darbā (21)) vai citām modernām, atbilstošām metodēm.

47. Alternatīvi atbildreakciju modelē kā modeļa parametra procentuālo daļu vai proporciju, kas tiek interpretēta kā kontroles vidējā reakcija. Tādos gadījumos normālo (logistisko, Veibula) sigmoīdo līkni bieži vien viegli pielāgot rezultātiem, izmantojot probita regresijas procedūru (21). Tādos gadījumos svēršanas funkcija jāpielāgo metriskām atbildreakcijām, kā norādījis Kristensens *(Christensen)* (36). Savukārt tad, ja ir novērota hormēze, probita analīze būtu jāaizstāj ar četru parametru logistisko vai Veibula funkciju, kas pielāgota ar nelineāras regresijas procedūru (36). Ja datiem nevar piemeklēt piemērotu devas–atbildreakcijas funkciju, EC_x un tās ticamības intervālu aprēķināšanai var izmantot alternatīvas metodes, piemēram, slīdošos vidējos pēc Tompsona *(Thompson)* (22) un saīsināto Spīrmena–Kerbera metodi (23).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

48. Testēšanas pārskatā jāiekļauj turpmāk norādītā informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

— fizikālais veids un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības (piemēram, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens);

— testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskais nosaukums *IUPAC* nomenklatūrā, *CAS* numurs, partija, sērija, struktūrformula un tīrība;

— parauga derīguma termiņš.

Testējamās sugas:

— izmantotie testa dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu izcelsme un audzēšanas apstākļi.

Testēšanas apstākļi:

— mākslīgās augsnes sastāvdaļas un sagatavošana;

▼M6

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas metode;

— testēšanas apstākļu apraksts, tostarp temperatūras, mitruma satura, pH u. c. raksturojums;

— eksperimenta plāna un procedūru pilnīgs apraksts.

Testa rezultāti:

— pieaugušo tārpu mirstība pēc divām nedēļām un jauno īpatņu skaits diapazona noteikšanas testa beigās;

— pieaugušo tārpu mirstība pēc trīs nedēļu ekspozīcijas un pilnīgi dati par jaunajiem īpatņiem galīgā testa beigās;

— visi novērotie testa organismu fiziskie vai patoloģiskie simptomi un uzvedības izmaiņas;

— vairošanās LC_{50}, *NOEC* un/vai EC_x (piemēram, EC_{50}, EC_{10}), ja kāds no šiem rādītājiem ir piemērojams, norādot ticamības intervālus un pieteiklētā modeļa grafiku, kas izmantots tā aprēķināšanai, visa rezultātu interpretācijai noderīgā informācija un novērojumi.

Jāziņo par atkāpēm no procedūrām, kas aprakstītas šajā testēšanas metodē, un visiem neraksturīgiem notikumiem testēšanas laikā.

LITERATŪRA

(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. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and 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 pp.

(5) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Slieku akūtas toksicitātes tests".

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid Cognettia sphagnetorum (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 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. and 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. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) 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. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus Enchytraeus. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. and 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. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 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. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (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. Statist. 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, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 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. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testēšanas metodē ir izmantotas turpmāk sniegtās definīcijas.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

EC_x (ietekmes koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, kas konkrētā ekspozīcijas periodā uz testa organismiem atstāj x % ietekmi salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Šajā testā ietekmes koncentrācijas izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LC_0 (neletālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nenonāvē nevienu no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_0 izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LC_{50} (medianālā letālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nonāvē 50 % no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_{50} izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LC_{100} (pilnīgi letālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nonāvē 100 % no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_{100} izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LOEC (zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija) ir zemākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ar statistiski nozīmīgu ietekmi ($p < 0,05$). Šajā testā *LOEC* izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību. Visām koncentrācijām, kas ir lielākas nekā *LOEC*, normāli vajadzētu būt ietekmei, kas statistiski atšķiras no kontrolgrupas rādītāja. Jebkādas atkāpes no iepriekš minētā, nosakot *LOEC*, jāpamato testēšanas pārskatā.

NOEC (nenovērojamās ietekmes koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas augstākā koncentrācija, kas ir tieši zem *LOEC* un kurai nav novērojamas ietekmes. Šajā testā *NOEC* atbilstošajai koncentrācijai konkrētā ekspozīcijas periodā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$) salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

Vairošanās ātrums ir vidējais izšķīlušos jauno tārpu skaits uz pieaugušo skaitu testēšanas laikā.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Maksimālās ūdensnoturspējas noteikšana

Mākslīgās augsnes ūdensnoturspējas noteikšana

Turpmākā metode ir atzīta par pieņemamu. Tā ir aprakstīta ISO DIS 11268-2 C pielikumā.

Ievāciet noteiktu daudzumu (piemēram, 5 g) testējamās augsnes substrāta ar piemērotu ierīci (gliemežcauruli u. c.). Nosedziet caurules apakšu ar filtrpapīra gabalu un pēc uzpildīšanas ar ūdeni novietojiet to uz statīva ūdens vannā. Caurule pakāpeniski jāiegremdē, līdz ūdens līmenis pārsniedz augsnes virsējo līmeni. Tad tā jāatstāj ūdenī apmēram uz trīs stundām. Tā kā nav iespējams iegūt visu ūdeni, kas uzsūcies augsnes kapilāros, augsnes paraugam būtu divas stundas jāļauj notecēt, novietojot cauruli uz ļoti slapju smalki samaltu kvarca smilšu dobītes noslēgtā traukā (lai novērstu izžūšanu). Tad paraugs jānosver un jāizžāvē līdz konstantai masai 105 °C. Ūdensnoturspēju *(WHC)* var aprēķināt šādi:

$$WHC\ (\%\ \text{sausmasas}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kur:

S = ūdens piesātinātais substrāts + caurules masa + filtrpapīra masa

T = tara (caurules masa + filtrpapīra masa)

D = substrāta sausmasa

ATSAUCES:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

3. papildinājums

Augsnes PH noteikšana

Turpmākā metode augsnes pH noteikšanai balstās uz aprakstu ISO 10390 ("Augsnes kvalitāte – pH noteikšana").

Noteiktu augsnes daudzumu vismaz 12 stundas žāvē istabas temperatūrā. Tad vismaz 5 gramus augsnes suspendē piecreiz lielākā tilpumā vai nu 1 M analītiskās tīrības pakāpes kālija hlorīda (KCl), vai 0,01 M analītiskās tīrības pakāpes kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma. Tad suspensiju kārtīgi krata piecas minūtes. Pēc kratīšanas suspensijai ļauj nosēsties vismaz 2 stundas, bet ne ilgāk kā 24 stundas. Tad izmēra šķidrās fāzes pH ar pH mērītāju, kas pirms katra mērījuma kalibrēts, izmantojot atbilstošu buferšķīdumu sēriju (piemēram, pH 4,0 un 7,0).

ATSAUCES:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

4. papildinājums

***Enchytraeus* sugu kultivēšanas apstākļi**

Enchytraeus albidus (kā arī citas sīkslieku *(Enchytraeus)* ģints sugas) var kultivēt lielās plastmasas kastēs (piemēram, 30 × 60 × 10 cm), kas aizpildītas ar mākslīgās augsnes un nekontaminētas dabiskas dārza augsnes maisījumu attiecībā 1:1. Jāizvairās no komposta materiāla izmantošanas, jo tas var saturēt toksiskas ķīmiskās vielas, piemēram, smagos metālus. Pirms izmantošanas augsne jāatbrīvo no faunas (piemēram, sasaldējot). Var izmantot arī substrātu tikai no mākslīgās augsnes, bet vairošanās ātrums var būt zemāks nekā tas, ko var panākt ar jauktas augsnes substrātu. Kultivēšanai izmantojamā substrāta pH jābūt 6,0 ± 0,5.

Kultūru glabā tumsā 15 līdz 20 °C ± 2 °C temperatūrā. Jāizvairās no temperatūras, kas ir augstāka nekā 23 °C. Jārūpējas, lai augsne būtu mitra, bet ne slapja. Par pareizu augsnes mitruma saturu liecina mazu ūdens lāsīšu parādīšanās starp pirkstiem, maigi saspiežot augsni. Jāizvairās no bezskābekļa apstākļu rašanās, nodrošinot to, ka kultūras konteineru vāki nodrošina adekvātu gāzu apmaiņu ar atmosfēru. Augsne katru nedēļu ir rūpīgi jāuzirdina, lai veicinātu apskābekļošanu.

Tārpus var barot ar auzu pārslām. Auzas jāglabā noslēgtos traukos un jāautoklavē vai jāuzkarsē pirms izmantošanas, lai izvairītos no miltu ērču (piemēram, *Glyzyphagus* sugas, *Astigmata, Acarina*) vai plēsīgu ērču (piemēram, *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*) invāzijas. Pēc termiskas apstrādes barība ir jāsamaļ, lai to var viegli uzkaisīt uz augsnes virskārtas. Laiku pa laikam auzu pārslas var papildināt ar vitamīniem, pienu vai mencu aknu eļļu. Citi piemēroti barības avoti ir pārtikas raugs un zivju barība *TetraMin*.

Barošana notiek apmēram divas reizes nedēļā. Atbilstošs daudzums auzu pārslu tiek uzkaisīts augsnes virskārtai vai arī rūpīgi iemaisīts substrātā augsnes uzirdināšanas laikā, lai veicinātu apskābekļošanu. Absolūtais dodamās barības daudzums ir atkarīgs no tārpu skaita substrātā. Barības daudzums būtu jāpalielina, ja tā visa tiek apēsta dienas laikā pēc uzkaisīšanas. Pretējā gadījumā, ja barība joprojām palikusi virskārtā, kad pienācis otrās barošanas laiks (pēc nedēļas), tās daudzums ir jāsamazina. Barība, kas kontaminēta ar sēnīšu kolonijām, jāaizvāc un jāaizstāj. Pēc trīs mēnešiem tārpi jāpārliek svaigi sagatavotā substrātā.

Kultivēšanas apstākļi uzskatāmi par apmierinošiem, ja tārpi: a) nemēģina atstāt augsnes substrātu, b) ātri pārvietojas cauri augsnei, c) ir ar spīdīgu ārējo virsmu bez pielipušām augsnes daļiņām, d) ir vairāk vai mazāk bālgani, e) kultūrās ir atrodami dažādos vecumos un f) nepārtraukti vairojas.

▼M6

5. papildinājums

Testa norise ar citām sīkslieku ģints (*Enchytraeus)* sugām

Sugu izvēle

Var izmantot ne tikai *E. albidus*, bet arī citas sīkslieku sugas, taču tad attiecīgi ir jāpielāgo testa procedūra un derīguma kritēriji. Tā kā daudzas sīkslieku sugas ir viegli pieejamas un ir viegli uzturamas laboratorijā, vissvarīgākais kritērijs, kas mudina izvēlēties citu sugu, nevis *E. albidus*, ir ekoloģiskais nozīmīgums un papildus – salīdzināms jutīgums. Sugas maiņai var būt arī formāli iemesli. Piemēram, valstīs, kurās *E. albidus* nav sastopama un to nevar importēt (piemēram, karantīnas ierobežojumu dēļ), vajadzēs izmantot citas sīkslieku sugas.

Piemērotu alternatīvu sugu piemēri

— *Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe,* 1992). Pēdējos gados šo sugu bieži izmanto ekotoksikoloģiskajos pētījumos, jo tās pārstāvjus ir vienkārši audzēt un testēt. Tomēr tā ir sīka un to ir sarežģītāk izmantot nekā *E. albidus* (jo īpaši posmos pirms iekrāsošanas metodes izmantošanas). Nav drošu liecību, ka *E. crypticus* eksistē laukā – tā ir aprakstīta tikai pēc slieku kultūrām. Tāpēc tās ekoloģiskās prasības nav zināmas.

— *Enchytraeus buchholzi* (*Vejdovsky,* 1879). Šis vārds, iespējams, apzīmē cieši radniecīgu sugu grupu, ko morfoloģiski ir grūti atšķirt. Tās izmantošana testēšanā nav ieteicama, iekams var noteikt testā izmantojamo īpatņu sugu. *E. buchholzi* parasti ir sastopamas pļavās un traucējumu skartās vietās, piemēram, ceļmalās.

— *Enchytraeus luxuriosus.* Šī suga sākotnēji bija pazīstama kā *E. minutus,* bet nesen tikusi aprakstīta (1). To atklāja U. Grēfe (*U. Graefe,* Hamburga) pļavā netālu no Sanktpēterordingas (*St. Peter-Ording,* Šlēsviga-Holšteina, Vācija). *E. luxuriosus* ir apmēram divreiz mazākas par *E. albidus*, bet lielākas nekā citu šeit aprakstīto sugu pārstāvji; tā varētu būt laba *E. albidus* alternatīva.

— *Enchytraeus bulbosus* (*Nielsen & Christensen,* 1963). Līdz šim ziņojumi par šo sugu bijuši no Vācijas un Spānijas minerālaugsnēm, kur tā ir izplatīta, bet parasti ne īpaši lielās populācijās. Salīdzinājumā ar citām šīs ģints sīkajām sugām to ir salīdzinoši viegli identificēt. Nekas nav zināms par tās uzvedību laboratorijas testos vai tās jutīgumu pret ķīmiskajām vielām. Tomēr ir atklāts, ka tās ir viegli kultivēt (*E. Belotti*, personīgā saziņā).

Audzēšanas apstākļi

Visas iepriekš minētās sīkslieku ģints *(Enchytraeus)* sugas var kultivēt tajos pašos substrātos, ko izmanto *E. albidus.* Tā kā šo sugu pārstāvji ir mazāki, kultūras trauki var būt mazāki un, lai gan var izmantot to pašu barību, jākoriģē porciju lielums. Šo sugu dzīves cikls ir īsāks nekā *E. albidus*, un barošana jāveic biežāk.

Testēšanas apstākļi

Testēšanas apstākļi kopumā ir tādi paši kā *E. albidus*, izņemot to, ka:

— testēšanas trauka izmērs var būt mazāks (bet tas nav obligāti);

— vairošanās testa ilgums var būt īsāks (bet tas nav obligāti), t. i., četras nedēļas sešu vietā; tomēr diapazona noteikšanas testa ilgumu nevajadzētu mainīt;

— ņemot vērā jauno tārpu nelielo izmēru, lai skaitīt būtu vieglāk, ļoti ieteicams izmantot iekrāsošanas metodi;

— derīguma kritērijs, kas attiecas uz "jauno īpatņu skaitu katrā testēšanas traukā kontrolesgrupā" būtu jānomaina uz "50".

▼**M6**

ATSAUCES

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

6. papildinājums

Ekstrakcijas tehniku detalizēts apraksts

Iekrāsošana ar bengāļu sarkano

Šo metodi, ko sākotnēji izstrādāja limnoloģijā (1), pirmoreiz izmantošanai jauno sīkslieku skaitīšanai *Enchytraeidae* vairošanās testā ierosināja V. de Koens *(W. de Coen)* (Ģentes Universitāte, Beļģija). Neatkarīgi no viņa modificētu versiju (bengāļu sarkanā un formaldehīda, nevis etilspirta maisījums) izstrādāja Nīderlandes Nacionālais sabiedrības un vides veselības institūts Bilthovenā (*RIVM Bilthoven*) (2)(3).

Galīgā testa beigās (t. i., pēc sešām nedēļām) augsni no testēšanas traukiem pārliek seklā konteinerā. Šim nolūkam noder Bellaplasta trauks vai gaismas baseins ar rievotu apakšdaļu – pēdējais tāpēc, ka rievas ierobežo tārpu pārvietošanos novērošanas lauka ietvaros. Jaunos īpatņus fiksē ar etilspirtu (apmēram 5 ml uz replikātu). Tad traukus uzpilda ar ūdeni līdz 1–2 cm slānim. Pievieno dažus pilienus (200 līdz 300 µl) bengāļu sarkanā (1 % etilspirta šķīdums) (alternatīvi: 0,5 % eozīna) un abas sastāvdaļas rūpīgi samaisa. Pēc 12 stundām tārpiem būtu jāiekrāsojas sarkanīgā krāsā un būtu jābūt viegli saskaitāmiem, jo tie gulēs uz substrāta virskārtas. Alternatīvi substrāta/spirta maisījumu pirms tārpu skaitīšanas var izskalot caur sietu (acu izmērs: 0,250 mm). Izmantojot šo procedūru, kaolinīts, kūdra un daļa smilšu izskalosies un būs vieglāk saskatīt un saskaitīt sārti iekrāsotos tārpus. Skaitīšanu atvieglo arī izgaismotu lēcu (lēcu izmērs: vismaz 100 × 75 mm; palielinājums: 2–3×) izmantošana.

Iekrāsošanas tehnika samazina skaitīšanas laiku līdz dažām minūtēm uz trauku un – orientējoši –vienam cilvēkam vajadzētu spēt novērtēt visus viena testa traukus ne ilgāk kā divās dienās.

Mitrā ekstrakcija

Mitrā ekstrakcija būtu jāsāk uzreiz pēc testa beigām. Augsni no katra trauka ievieto uz plastmasas sietos ar apmēram 1 mm acīm. Tad sietus iekar plastmasas bļodās tā, lai tie nepieskartos apakšdaļai. Bļodas rūpīgi uzpilda ar ūdeni, līdz paraugi sietos ir pilnībā iegrimuši ūdenī. Lai nodrošinātu vairāk nekā 90 % klātesošo tārpu atgūšanas rādītāju, būtu jāizmanto trīs dienu ekstrakcijas periods 20 ± 2 °C temperatūrā. Ekstrakcijas perioda beigās sietus aizvāc un ūdeni (izņemot nelielu daudzumu) lēnām nolej, uzmanoties neizliet sedimentus bļodu apakšdaļā. Tad plastmasas bļodas viegli sakrata, lai suspendētu nogulsnes virsējā ūdenī. Ūdeni pārlej Petri platē un pēc tam, kad augsnes daļiņas ir nosēdušās, sīkslieka var identificēt, aizvākt un saskaitīt ar stereomikroskopu un fleksiblu tērauda pinceti.

Flotācija

R. Kupermans *(R. Kuperman)* piezīmē aprakstījis uz flotāciju balstītu metodi (4). Pēc testēšanas trauka satura fiksācijas ar etilspirtu augsni applūdina ar *Ludox* (AM-30 koloidālais silīcijs, 30 masas % suspensija ūdenī) līdz 10–15 mm virs augsnes virskārtas. Pēc augsnes un flotācijas līdzekļa rūpīgas maisīšanas 2–3 minūtes var viegli saskaitīt jaunos tārpus, kas peld pa virsu.

ATSAUCES

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and 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 pp.

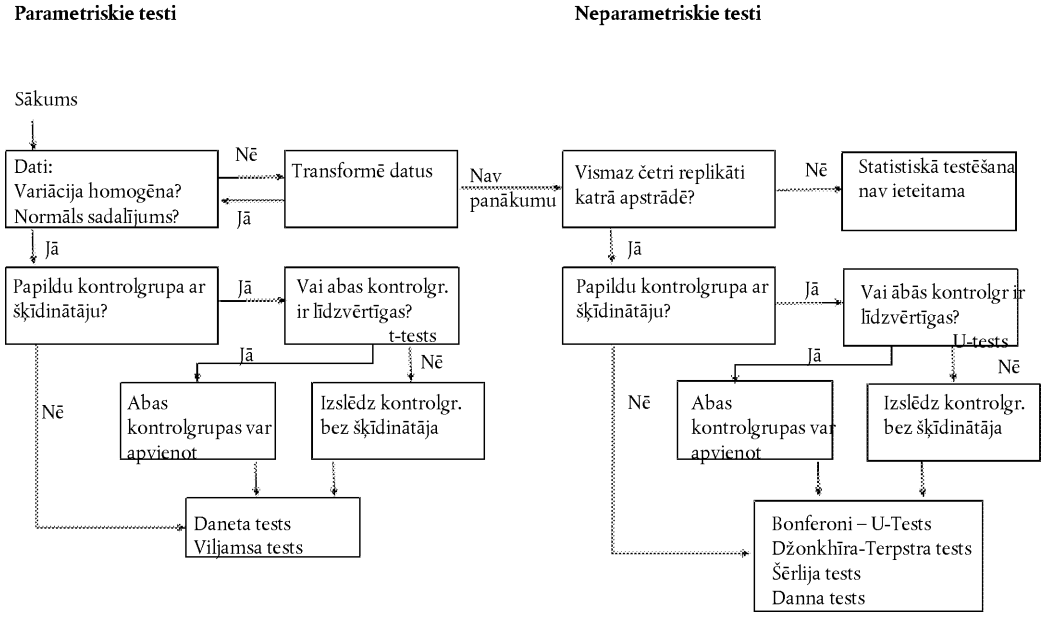
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of Enchytraeus crypticus in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and 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, p. 157.

▼**M6**

7. papildinājums

Statistiskās datu novērtēšanas (*NOEC* noteikšanas) pārskats



▼M6

C.33. SLIEKU VAIROŠANĀS TESTS *(EISENIA FETIDA / EISENIA ANDREI)*

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 222 (2004. gads). Tā ir izveidota, lai novērtētu augsnē esošo ķīmisko vielu ietekmi uz Kalifornijas sarkano hibrīdslieku *(Eisenia fetida)* (*Savigny*, 1826) vai mēslu slieku *(Eisenia andrei)* (*Andre*, 1963) vairošanās rādītāju (un citiem subletāliem beigupunktiem) (1)(2). Tests ir pārbaudīts starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3). Pastāv slieku akūtās toksicitātes testēšanas metode (4). Ir publicētas vairākas citas starptautiskas un nacionālas vadlīnijas par slieku akūtās un hroniskās toksicitātes testiem (5)(6)(7)(8).

2. Kalifornijas sarkano hibrīdslieku *(Eisenia fetida)* / mēslu slieku *(Eisenia andrei)* uzskata par augsnes faunas un konkrēti slieku pārstāvēm. Pamatinformācija par slieku ekoloģiju un to izmantošanu ekotoksikoloģiskajos pētījumos ir pieejama (7)(9)(10)(11)(12).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

3. Pieaugušie tārpi tiek pakļauti virknei testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, kas ir vai nu iejaukta augsnē, vai (pesticīdu gadījumā) ievadīta augsnē vai uzsmidzināta augsnei, izmantojot paņēmienus, kas atbilst ķīmiskās vielas lietošanas veidam. Metodes lietojums ir specifisks testa nolūkam. Testējamo koncentrāciju diapazonu izvēlas, lai iezīmētu tās, kas astoņu nedēļu laikā varētu atstāt gan subletālu, gan letālu ietekmi. Pieaugušo tārpu mirstību un ietekmi uz augšanu nosaka četras nedēļas pēc ekspozīcijas. Tad pieaugušie indivīdi tiek aizvākti no augsnes un ietekmi uz vairošanos novērtē pēc vēl četrām nedēļām, saskaitot augsnē klātesošos slieku pēcnācējus. Testējamās ķīmiskās vielas ekspozīcijai pakļauto tārpu vairošanās rādītāju salīdzina ar kontrolgrupas rādītāju(-iem), lai noteiktu i) nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)* un/vai ii) EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}), lietojot regresijas modeli, lai aplēstu koncentrāciju, kas izraisītu vairošanās rādītāja samazināšanos par x %. Testējamām koncentrācijam ir jāaptver EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}), lai EC_x iegūtu interpolējot, nevis ekstrapolējot (sk. definīcijas 1. papildinājumā).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

4. Lai palīdzētu atbilstošu testēšanas procedūru izveidei, jābūt pieejamai šādai informācijai par testējamo ķīmisko vielu:

   — šķīdība ūdenī;

   — log K_{ow};

   — tvaika spiediens;

   — un informācija par apriti vidē un mijiedarbību ar to, ja tā ir iespējama (piemēram, fotolīzes un hidrolīzes rādītājs, ja tas ir būtiski lietošanas veidiem).

5. Šī testēšanas metode ir izmantojama visām ķīmiskajām vielām neatkarīgi no to šķīdības ūdenī. Šī testēšanas metode nav piemērojama nedz gaistošām ķīmiskajām vielām, t. i., ķīmiskajām vielām, kurām Henrija konstante vai gaisa/ūdens sadalījuma koeficients ir lielāks nekā viens, nedz arī ķīmiskajām vielām, kuru tvaika spiediens pārsniedz 0,0133 Pa 25 °C temperatūrā.

6. Šajā testēšanas metodē netiek ņemtā vērā iespējamā testējamās ķīmiskās vielas degradācija testēšanas laikā. Līdz ar to nevar pieņemt, ka ekspozīcijas koncentrācijas visu testēšanas laiku saglabāsies sākotnējā līmenī. Tādā gadījumā ir ieteicama testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskā analīze testēšanas sākumā un beigās.

▼M6

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

7. Jānosaka ķīmiskās standartvielas *NOEC* un EC_x, lai pārliecinātos, ka laboratorijas testa apstākļi ir piemēroti un ka testa organismu reakcija laika gaitā statistiski nemainās. Ieteicams ķīmisko standartvielu testēt vismaz reizi gadā vai arī, ja testēšana notiek retāk, veikt to paralēli ar testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes noteikšanu. Karbendazīms vai benomils ir piemērotas ķīmiskās standartvielas, kuru ietekme uz vairošanos ir pierādīta (3). Būtisks efekts būtu jānovēro starp a) 1 un 5 mg aktīvās vielas (AV) uz kg sausās masas un b) 250–500 g/ha jeb 25–50 mg/m^2. Ja testu virknē iekļauj pozitīvu toksisko standartu, izmanto vienu koncentrāciju, un replikātu skaitam jābūt tādam pašam kā kontrolgrupas replikātu skaitam.

TESTA DERĪGUMS

8. Lai testa rezultāts būtu uzskatāms par derīgu, kontrolgrupas replikātos ir jābūt izpildītiem šādiem kritērijiem:

— katrā replikātā (ar 10 pieaugušajiem) testēšanas beigās jābūt izšķīlušamies ≥ 30 jaunajiem īpatņiem;

— vairošanās variācijas koeficientam jābūt ≤ 30 %

— pieaugušo īpatņu mirstībai sākotnējās četrās testēšanas nedēļās jābūt ≤ 10 %.

Ja tests neatbilst iepriekš minētajiem derīguma kritērijiem, tas jāpārtrauc, ja vien nav iespējams sniegt pamatojumu testa turpināšanai. Pamatojums jāiekļauj pārskatā.

TESTA APRAKSTS

Aparatūra

9. Jāizmanto testēšanas konteineri no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla ar tilpumu apmēram viens vai divi litri. Konteineru šķērsgriezuma laukumam jābūt apmēram 200 cm^2, lai substrātā tiktu nodrošināts mitrums apmēram 5–6 cm dziļumā, kad tiek pievienoti 500–600 g substrāta sausmasas. Konteinera vāka konstrukcijai būtu jāļauj notikt gāzu apmaiņai starp substrātu un atmosfēru un jānodrošina gaismas piekļuve (piemēram, perforēts, caurspīdīgs vāks), vienlaikus neļaujot tārpiem izkļūt. Ja substrāta daudzums ir ievērojami lielāks nekā 500 līdz 600 g uz testēšanas konteineru, tārpu skaits būtu proporcionāli jāpalielina.

10. Nepieciešams laboratorijas standartaprīkojums, jo īpaši:

— žāvēšanas skapis;

— stereomikroskops;

— pH mērītājs un fotometrs;

— piemēroti, precīzi svari;

— piemērota temperatūras kontroles ierīce,

— piemērota mitruma kontroles ierīce (nav nepieciešama, ja ekspozīcijas traukiem ir vāki);

— inkubators vai maza telpa ar gaisa kondicionētāju;

— pincetes, āķi vai cilpas;

— ūdens vanna.

▼M6

Mākslīgās augsnes sagatavošana

11. Šajā testā (5)(7) izmanto mākslīgo augsni ar šādu sastāvu (pamatojoties uz saussvariem, žāvējot līdz konstantam svaram 105 °C temperatūrā):

— 10 % sfagnu kūdras (tik tuvu pH 5,5 līdz 6,0, cik vien iespējams, bez redzamām augu atliekām, smalki samaltas, izžāvētas līdz izmērītam mitruma saturam);

— 20 % kaolīna mālu (vēlamais kaolinīta saturs – virs 30 %);

— 0,3 līdz 1,0 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$, pulverizēta, analītiskās tīrības pakāpes), lai iegūtu sākotnējo pH 6,0 ± 0,5;

— 70 % gaisžāvētu kvarca smilšu (atkarībā no nepieciešamā $CaCO_3$ daudzuma), lielākoties smalku smilšu, kas vairāk nekā par 50 % sastāv no daļiņām ar izmēru 50 līdz 200 mikroni.

1. piezīme. Nepieciešamais $CaCO_3$ daudzums būs atkarīgs no augsnes substrāta sastāvdaļām, tostarp barības, un tas būtu jānosaka ar augsnes apakšparaugu mērījumiem uzreiz pirms testēšanas. pH mēra jauktā paraugā 1 M kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīdumā (13).

2. piezīme. Mākslīgās augsnes organiskā oglekļa saturu var samazināt, piemēram, samazinot kūdras saturu līdz 4–5 % un attiecīgi palielinot smilšu saturu. Šādi samazinot organiskā oglekļa saturu, var samazināties iespējamība, ka testējamā ķīmiskā viela adsorbēsiesaugsnē (organiskajā ogleklī) un palielināties testējamās ķīmiskās vielas pieejamība tārpiem. Ir pierādīts, ka tests ar Kalifornijas sarkano hibrīdslieku var izpildīt vairošanās derīguma kritērijus, ja tās testē lauka augsnē ar zemāku organiskā oglekļa saturu, nekā minēts iepriekš (piemēram, 2,7 %) (14), kā arī ir gūta pieredze, ka to var panākt arī ar mākslīgu augsni, kura satur 5 % kūdras. Tāpēc nav nepieciešams pirms šādas augsnes izmantošanas galīgajā testā pierādīt mākslīgās augsnes atbilstību, jo var pieļaut, ka tests atbilst derīguma kritērijiem, ja vien kūdras saturs nav samazināts vairāk, nekā iepriekš norādīts.

3. piezīme. Izmantojot dabisko augsni papildu (piemēram, augstāka līmeņa) testēšanā, arī ir jāpierāda augsnes piemērotība un testa derīguma kritēriju izpilde.

12. Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi samaisa (piemēram, liela izmēra laboratorijas maisītājā) labi vēdinātā vietā. Pirms testa sākšanas sauso mākslīgo augsni samitrina, pievienojot pietiekami daudz dejonizēta ūdens, lai iegūtu apmēram pusi galīgā ūdens satura, kas ir 40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas (atbilst 50 ± 10 % mitruma sausmasā). Tā iegūst substrātu bez stāvoša ūdens vai brīva ūdens, kad to saspiež plaukstā. Mākslīgās augsnes maksimālo ūdensnoturspēju *(WHC)* nosaka saskaņā ar 2. papildinājumā, ISO 11274 (15) vai līdzvērtīgā ES standartā aprakstītajām procedūrām.

13. Ja testējamo ķīmisko vielu uzklāj uz augsnes virskārtas vai iejauc augsnē bez ūdens, galīgo ūdens daudzumu var iejaukt mākslīgajā augsnē tās sagatavošanas laikā. Ja testējamā ķīmiskā viela tiek iejaukta augsnē kopā ar nelielu daudzumu ūdens, papildu ūdeni var pievienot kopā ar testējamo ķīmisko vielu (sk. 19. punktu).

14. Augsnes mitruma saturu nosaka testēšanas sākumā un beigās saskaņā ar ISO 11465 (16) vai līdzvērtīgu ES standartu, bet augsnes pH – saskaņā ar 3. papildinājumu vai ISO 10390 (13), vai līdzvērtīgu ES standartu. Šie mērījumi būtu jāveic augsnes kontrolparaugā un katrā testējamās koncentrācijas

▼M6

augsnes paraugā. Augsnes pH nedrīkst pielāgot, ja tiek testētas skābas vai bāziskas ķīmiskās vielas. Mitruma saturs jāmonitorē visu testēšanas laiku, periodiski nosverot konteinerus (sk. 26. un 30. punktu).

Testa dzīvnieku izvēle un sagatavošana

15. Testēšanā izmanto Kalifornijas sarkano hibrīdslieku *(Eisenia fetida)* vai mēslu slieku *(Eisenia andrei)* (1)(2). Lai sāktu testēšanu, ir vajadzīgi pieauguši tārpi vecumā no diviem mēnešiem līdz vienam gadam un ar jostiņu. Tārpi būtu jāizvēlas no sinhronizētas kultūras ar relatīvi homogēnu vecuma struktūru (4. papildinājums). Testa grupas īpatņu vecumam nevajadzētu atšķirties vairāk kā par četrām nedēļām.

16. Izvēlētie tārpi vismaz vienu dienu jāaklimatizē tāda tipa mākslīgās augsnes substrātā, ko paredzēts izmantot testēšanā. Šā perioda laikā tārpi jābaro ar to pašu barību, ko izmantos testēšanā (sk. 31. līdz 33. punktu).

17. Grupas pa 10 tārpiem būtu atsevišķi jānosver un pēc nejaušības principa jāsadala pa testēšanas konteineriem testēšanas sākumā. Pirms nosvēršanas tārpi ir jānomazgā (ar dejonizētu ūdeni) un liekais ūdens ir jāaizvāc, īsu brīdi paturot tārpus uz filtrpapīra. Atsevišķo tārpu mitrajam svaram vajadzētu būt no 250 līdz 600 mg.

Testējamo koncentrāciju sagatavošana

18. Var izmantot divas testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas metodes: testējamās ķīmiskās vielas iejaukšanu augsnē (sk. 19.–21. punktu) vai uzklāšanu uz augsnes virskārtas (sk. 22.–24. punktu). Piemērotas metodes izvēle ir atkarīga no testa nolūka. Parasti ir ieteicama testējamās ķīmiskās vielas iejaukšana augsnē. Tomēr var būt nepieciešams lietot ievadīšanas procedūras, kas atbilst parastajai lauksaimniecības praksei (piemēram, šķidrā preparāta izsmidzināšana vai īpašu pesticīdu preparātu izmantošana, piemēram, granulas vai sēklu kodinātāji). Šķīdinātāji, ko izmanto, lai augsni būtu vieglāk apstrādāt ar ķīmiskajām vielām, būtu jāizvēlas, pamatojoties uz to zemo toksicitāti attiecībā uz sliekām, un testēšanas plānā jāiekļauj atbilstoša šķīdinātāja kontrole (sk. 27. punktu).

Testējamās ķīmiskās vielas iejaukšana augsnē

Ūdenī šķīstoša testējamā ķīmiskā viela

19. Tieši pirms testēšanas sākšanas pagatavo testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu dejonizēta ūdens daudzumā, kas ir pietiekams visiem vienas testējamās koncentrācijas replikātiem. Lai atvieglotu testējamā šķīduma sagatavošanu, var būt nepieciešams palīgšķīdinātājs. Ir lietderīgi sagatavot šķīdumu tādā daudzumā, kāds nepieciešams, lai sasniegtu galīgo mitruma saturu (40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas). Šķīdumu rūpīgi sajauc ar augsnes substrātu pirms ievadīšanas testēšanas konteinerā.

Ūdenī nešķīstoša testējamā ķīmiskā viela

20. Testējamo ķīmisko vielu izšķīdina nelielā daudzumā piemērota organiskā šķīdinātāja (piemēram, acetona) un tad uzsmidzina uz nelielā daudzuma smalku kvarca smilšu vai tajās iejauc. Tad šķīdinātāju iztvaicē, vismaz dažas minūtes turot trauku velkmes skapī. Apstrādātās smiltis rūpīgi iejauc iepriekš samitrinātajā mākslīgajā augsnē. Pēc tam, lai sasniegtu galīgo mitruma saturu – 40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas –, pievieno un iejauc dejonizētu ūdeni (nepieciešamajā daudzumā). Tad augsne ir gatava ievietošanai testēšanas konteineros (traukos). Jāuzmanās no tā, vai šķīdinātāji nav sliekām toksiski.

▼M6

Ūdenī un organiskajos šķīdinātājos nešķīstoša testējamā ķīmiskā viela

21. Pagatavo maisījumus no 10 g smalki samaltu rūpniecisko kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas daudzumā, kas nepieciešams testējamās koncentrācijas sasniegšanai augsnē. Pēc tam maisījumu rūpīgi iejauc iepriekš samitrinātajā mākslīgajā augsnē. Pēc tam, lai sasniegtu galīgo mitruma saturu – 40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas –, pievieno un iejauc dejonizētu ūdeni (nepieciešamajā daudzumā). Tad augsne ir gatava ievietošanai testēšanas konteineros.

Testējamās ķīmiskās vielas uzklāšana augsnes virskārtai

22. Augsni apstrādā pēc tam, kad ir pievienoti tārpi. Vispirms testēšanas konteinerus piepilda ar samitrināto augsnes substrātu un nosvērtos tārpus novieto uz virskārtas. Veselīgi tārpi parasti uzreiz ierokas substrātā, un attiecīgi visus uz virskārtas palikušos pēc 15 minūtēm uzskata par bojātiem un aizstāj. Ja tārpus aizstāj, jaunpievienotie un aizstātie ir jānosver, lai būtu zināms eksponētās tārpu grupas kopējais dzīvsvars un tārpus saturošā konteinera kopsvars sākumā.

23. Ievada testējamo ķīmisko vielu. To nedrīkst pievienot augsnei pirmo pusstundu pēc tārpu ievietošanas (vai ja tārpi atrodas augsnes virskārtā), lai izvairītos no tiešas ekspozīcijas, testējamai ķīmiskajai vielai nonākot saskarē ar ādu. Ja testējamā ķīmiskā viela ir pesticīds, var būt piemēroti to uzsmidzināt uz augsnes virskārtas. Testējamā ķīmiskā viela būtu jāuzklāj uz augsnes virskārtas tik vienmērīgi, cik vien iespējams, izmantojot piemērotu laboratorijas mēroga izsmidzināšanas ierīci, lai simulētu aerosola izsmidzināšanu laukā. Pirms ievadīšanas būtu jānoņem testēšanas konteinera vāks un jāaizstāj ar ieliktni, kas pasargātu konteinera sānu sienas no aerosola. Ieliktni var pagatavot no testēšanas trauka ar noņemtu pamatni. Ievadīšanai būtu jānotiek 20 ± 2 °C temperatūrā un – dažādiem ūdenssķīdumiem, emulsijām vai dispersijām – ar ūdens izsmidzināšanas apjomu no 600 līdz 800 µl/m^2. Apjoms būtu jāpārbauda ar piemērotu kalibrācijas paņēmienu. Īpaši preparāti, piemēram, granulas vai sēklu kodinātājs, būtu jāuzklāj veidā, kas atbilst lauksaimnieciskajam lietojumam.

24. Testēšanas konteineri jāatstāj atvērti vienu stundu, lai ļautu iztvaikot visiem gaistošajiem šķīdinātājiem, ko izmanto testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanā. Jārūpējas, lai šajā laikā no testēšanas trauka neizkļūtu neviens tārps.

PROCEDŪRA

Testa grupas un kontrolgrupas

25. Ieteicamā proporcija ir 10 sliekas uz 500–600 g mākslīgās augsnes sausmasas (t. i., 50–60 g augsnes uz tārpu). Ja izmanto lielāku augsnes daudzumu, kā tas var būt, ja testē pesticīdus, kurus ievada īpašos veidos, piemēram, kā sēklu kodinātāju, proporcija 50–60 g augsnes uz tārpu jāsaglabā, palielinot tārpu skaitu. Katram kontrolgrupas un apstrādes konteineram sagatavo desmit tārpus. Tārpus noskalo ar ūdeni, noslauka un tad uz īsu brīdi novieto uz absorbējoša papīra, lai ļautu liekajam ūdenim notecēt.

26. Lai izvairītos no sistemātiskām kļūdām tārpu sadalē pa testēšanas konteineriem, testējamās populācijas homogenitāte būtu jānosaka, atsevišķi nosverot 20 tārpus, kas pēc nejaušības principa atlasīti no populācijas, no kuras ņem testējamos tārpus. Kad ir nodrošināta homogenitāte, tārpu partijas jāizvēlas, jānosver un jāsadala pa testēšanas konteineriem, izmantojot randomizācijas

▼M6

procedūru. Pēc testējamo tārpu pievienošanas jāizmēra katra testēšanas konteinera svars, lai nodrošinātu to, ka ir zināms sākotnējais svars, ko var izmantot par atskaites punktu augsnes mitruma satura monitoringam visu testa laiku, kā aprakstīts 30. punktā. Tad testēšanas konteinerus aizver, kā aprakstīts 9. punktā, un ievieto testēšanas kamerā.

27. Katrai testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas metodei, kas aprakstīta 18. līdz 24. punktā, sagatavo piemērotus kontrolparaugus. Sagatavojot kontrolparaugus, ievēro attiecīgās aprakstītās procedūras, izņemot to, ka nepievieno testējamo ķīmisko vielu. Tas nozīmē, ka attiecīgos gadījumos organiskos šķīdinātājus, kvarca smiltis un citas nesējvielas pievieno kontrolgrupas paraugiem tādās pašās koncentrācijās/daudzumos kā apstrādes paraugos. Ja testējamās ķīmiskās vielas pievienošanai izmanto šķīdinātāju vai citu nesējvielu, jāsagatavo arī papildu kontrolparaugs bez nesējvielas vai testējamās ķīmiskās vielas un jānotestē, lai pārliecinātos, ka nesējvielai nav ietekmes uz rezultātu.

Testēšanas apstākļi

28. Testēšanas temperatūra ir 20 ± 2 °C. Testu veickontrolētos gaismas un tumsas ciklos (vēlams, 16 stundas gaismas un astoņas stundas tumsas) pie 400 līdz 800 luksu apgaismojuma testēšanas konteineru zonā.

29. Testēšanas laikā testēšanas konteinerus nevēdina, taču testēšanas trauku vāku dizainam būtu jānodrošina gāzu apmaiņas iespēja, vienlaikus ierobežojot mitruma iztvaikošanu (sk. 9. punktu).

30. Augsnes substrāta ūdens saturu testēšanas konteineros uztur visā testēšanas laikā, periodiski pārsverot testēšanas konteinerus (bez to vākiem). Zudumus pēc vajadzības kompensē ar dejonizētu ūdeni. Ūdens saturam nevajadzētu par vairāk nekā 10 % atšķirties no sākotnējā.

Barošana

31. Jebkāda barība ar pierādītu kvalitāti, kas piemērota vismaz tārpu svara uzturēšanai testēšanas laikā, ir uzskatāma par pieņemamu. Pieredze liecina, ka piemērota barība ir auzu milti, govju vai zirgu mēsli. Būtu jāpārbauda, vai govis vai zirgi, no kuriem mēsli iegūti, nav saņēmuši medikamentus vai ārstēšanu ar ķīmiskajām vielām, piemēram, augšanas stimulantiem, attārpošanas vai līdzīgiem veterinārajiem produktiem, kas varētu nevēlami ietekmēt tārpus testēšanas laikā. Ir ieteicams ievākt govju mēslus pašiem, jo pieredze liecina, ka komerciāli pieejamie govju mēsli, ko izmanto dārza mēslošanā, var negatīvi ietekmēt tārpus. Mēsli pirms lietošanas jāizžāvē gaisā, smalki jāsamaļ un jāpasterizē.

32. Katra svaigā barības partija pirms izmantošanas testā jāiebaro netestējamajai tārpu kultūrai, lai pārliecinātos, ka tā ir piemērotas kvalitātes. Augšanai un kokonu ražošanai nevajadzētu samazināties salīdzinājumā ar tārpiem, kas turēti substrātā, kurš nesatur svaigu barības porciju (apstākļi atbilstoši testēšanas metodes C.8 aprakstam (4)).

33. Barību pirmoreiz pievieno vienu dienu pēc tārpu ievietošanas un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas augsnē. Katrā konteinerā augsnes virskārtai pārkaisa apmēram 5 g barības, ko samitrina ar dejonizētu ūdeni (apmēram 5 līdz 6 ml uz konteineru). Turpmāk barību pievieno reizi nedēļā četru nedēļu testēšanas periodā. Ja barība netiek apēsta, porcija būtu jāsamazina,

▼M6

lai izvairītos no sēnīšu augšanas vai pelējuma. Pieaugušos indivīdus no augsnes aizvāc 28. testēšanas dienā. Katram testēšanas konteineram pievieno papildu 5 g barības. Atlikušajās četrās testēšanas nedēļās papildu barošanas vairs nenotiek.

Testēšanas koncentrāciju izvēle

34. Atbilstošas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas izvēlē vajadzētu noderēt iepriekšējām zināšanām par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, piemēram, no akūtās toksicitātes testa (4) un/vai diapazona noteikšanas testiem. Kad nepieciešams, veic diapazona noteikšanas testu, piemēram, ar piecām testējamajām koncentrācijām – 0,1, 1,0, 10, 100 un 1 000 mg/kg (augsnes sausmasas). Katrai apstrādei un kontrolgrupai pietiek ar vienu paraugu. Diapazona noteikšanas testa ilgums ir divas nedēļas, un mirstību novērtē testa beigās.

Eksperimentālais plāns

35. Tā kā testam nevar noteikt tikai vienu summāro statistisko lielumu, šī testēšanas metode paredz iespēju noteikt *NOEC* un EX_x. Visticamāk, pārskatāmā nākotnē regulatīvās iestādes pieprasīs noteikt *NOEC*. Iespējams, drīzumā sāks plašāk izmantot EX_x, kas izriet no statistiskiem un ekoloģiskiem apsvērumiem. Tāpēc, pamatojoties uz starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rekomendācijām par sīkslieku vairošanās testa metodi (17), tiek piedāvāti trīs plāni.

36. Nosakot koncentrāciju diapazonu, būtu jāpatur prātā šādi apsvērumi.

— *NOEC* noteikšanai būtu jānotestē vismaz piecas/divpadsmit koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 2,0 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

— EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}) noteikšanai ir ieteicams izmantot adekvātu skaitu koncentrāciju, lai pie minētajām koncentrācijām iegūtu vismaz četras atbildreakcijas vidējās vērtības, kuru starpība būs statistiski nozīmīga. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami vismaz divi replikāti, kā arī vēl seši kontrolreplikāti. Kvocients var atšķirties, t. i., tas var būt mazāks par vai vienāds ar 1,8 paredzamajā ietekmes diapazonā un lielāks nekā 1,8 augstākām vai zemākām koncentrācijām.

— Kombinēta pieeja ļauj noteikt gan *NOEC*, gan EC_x. Būtu jāizmanto astoņas apstrādes koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai apstrādei ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 1,8 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

Testēšanas ilgums un mērījumi

37. 28. dienā novēro un saskaita pieaugušos tārpus. Reģistrē arī jebkādu neparastu uzvedību (piemēram, nespēju ierakties augsnē; nekustīgu gulēšanu) un morfoloģiskas izmaiņas (piemēram, atvērtas brūces). Tad visus pieaugušos tārpus izņem no testēšanas traukiem, saskaita un nosver. Tārpus saturošās augsnes pārnešana uz tīru paplāti pirms novērtēšanas var atvieglot pieaugušo īpatņu meklēšanu. Pirms nosvēršanas tārpi, kas izņemti no augsnes, ir jānomazgā (ar dejonizētu ūdeni) un liekais ūdens ir jāaizvāc, īsu brīdi paturot tārpus uz filtrpapīra. Visi tārpi, kas šajā laikā netiek atrasti, ir reģistrējami kā miruši, jo tiek pieņemts, ka šādi tārpi ir nomiruši un sadalījušies pirms novērtēšanas.

▼M6

38. Ja augsne ir bijusi aizvākta no konteineriem, tā ir jānovieto atpakaļ (bez pieaugušajiem tārpiem, bet ar tajā izveidotajiem kokoniem). Tad augsni papildu četras nedēļas inkubē tajos pašos testēšanas apstākļos, izņemot to, ka barošana notiek tikai vienreiz šīs testa fāzes sākumā (sk. 33. punktu).

39. Otrā 4 nedēļu perioda beigās nosaka jauno, no kokoniem izšķīlušos īpatņu un kokonu skaitu testējamajā augsnē, izmantojot procedūras, kas aprakstītas 5. papildinājumā. Testēšanas perioda laikā jāreģistrē arī visas tārpiem nodarīta kaitējuma vai bojājumu pazīmes.

Robežtests

40. Ja diapazona noteikšanas testā pie augstākās koncentrācijas (t. i., 1 000 mg/kg) nenovēro nekādu ietekmi, vairošanās testu veic kā robežtestu, izmantojot 1 000 mg/kg testa koncentrāciju. Robežtests sniegs iespēju pierādīt, ka vairošanās *NOEC* ir lielāka nekā robežkoncentrācija, vienlaikus līdz minimumam samazinot testā izmantojamo tārpu skaitu. Gan apstrādātajai augsnei, gan kontrolgrupai vajadzīgi astoņi replikāti.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

41. Lai gan 6. papildinājumā ir sniegts pārskats, šai testēšanas metodei nav galīgu statistisku norādījumu par testa rezultātu analizēšanu.

42. Viens beigupunkts ir mirstība. Vajadzētu reģistrēt arī izmaiņas pieaugušo īpatņu uzvedībā (piemēram, nespēju ierakties augsnē, gulēšanu nekustīgā stāvoklī pret testēšanas trauka stikla sienu) un morfoloģijā (piemēram, atvērtas brūces), kā arī jauno īpatņu klātbūtni. Lai noteiktu LC_{50}, parasti būtu jālieto probita analīze (18) vai logistiskā regresija. Tomēr gadījumos, kad šī analīzes metode nav piemērota (piemēram, ja ir pieejamas mazāk nekā trīs daļēji nāvējošas koncentrācijas), var izmantot alternatīvas metodes. Šīs metodes var būt slīdošie vidējie (19), saīsinātā Spīrmena–Kerbera metode (20) vai vienkārša interpolācija (piemēram, LC_0 un LC_{100} ģeometriskais vidējais, ko aprēķina, izvelkot kvadrātsakni no LC_0 un LC_{100} reizinājuma).

43. Otrs beigupunkts ir vaislība (t. i., radušos/izšķīlušos jauno īpatņu skaits). Tomēr, tāpat kā diapazona noteikšanas testā, galīgajā pārskatā ir jāiekļauj arī visas kaitējuma pazīmes. Statistiskajai analīzei vajag aprēķināt vairošanās aritmētisko vidējo $\bar{x}$ un standartnovirzi katrai apstrādes un kontroles grupai.

44. Ja ir veikta dispersijas analīze, standartnovirzi *(s)* un brīvības pakāpes *(df)* var aizstāt ar summārās dispersijas aplēsi, kas iegūta attiecīgi no *ANOVA* un tās brīvības pakāpēm, ar nosacījumu, ka dispersija nav atkarīga no koncentrācijas. Šajā gadījumā izmantojiet atsevišķās kontroles un apstrādes dispersijas. Šīs vērtības parasti aprēķina ar komerciālu statistikas programmu, par replikātiem izmantojot katra trauka rezultātus. Ja negatīvo un šķīdinātāja kontroļu datu apkopošana šķiet saprātīgāka nekā testēšana, salīdzinot ar vienu no tām, tās būtu jātestē, lai pārliecinātos, ka tās nav būtiski atšķirīgas (piemērotus testus sk. 47. punktā un 6. papildinājumā).

45. Papildu statistiskā testēšana un slēdziens ir atkarīgs no tā, vai replikātu vērtības atbilst normālsadalījumam un to dispersija ir homogēna.

▼M6

***NOEC* noteikšana**

46. Priekšroka ir jaudīgu testu lietošanai. Būtu jāizmanto informācija, piemēram, no iepriekšējās pieredzes ar starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu vai citiem vēsturiskiem datiem, par to, vai dati ir aptuveni normāli sadalīti. Būtiskāka ir dispersijas homogenitāte (homoskedastiskums). Pieredze liecina, ka nereti dispersija palielinās, palielinoties vidējām vērtībām. Tādos gadījumos homoskedastiskumu var panākt ar datu transformāciju. Tomēr šādai transformācijai būtu jābalstās uz pieredzi ar vēsturiskiem datiem, nevis pētāmajiem datiem. Homogēnu datu gadījumā būtu jāveic vairāki t-testi, piemēram, Viljamsa tests *(Williams' test)* (α = 0,05, vienpusējais) (21)(22) vai dažos gadījumos – Daneta tests *(Dunnett's test)* (23)(24). Jānorāda, ka nevienlīdzīgas replikācijas gadījumā, tabulas t vērtības jāizlabo atbilstoši Daneta un Viljamsa ieteikumiem. Reizēm atbildreakcijas nepalielinās/nesamazinās regulāri, jo ir plaša variācija. Tādā gadījumā – ja ir izteikta novirze no monotonitātes – piemērotāks ir Daneta tests. Ja ir novirzes no homoskedastiskuma, var būt pamatoti uzmanīgāk izmeklēt iespējamo ietekmi uz dispersijām, lai varētu izlemt, vai t-testus var izmantot bez būtiskiem jaudas zudumiem (25). Alternatīvi var izmantot multiplu U-testu, piemēram, Bonferoni U-testu *(Bonferroni U-test)* saskaņā ar Holmu (26), vai, ja šie dati ir heteroskedastiski, bet citādi ir atbilst pamatā esošai monotonai devas atbildreakcijai, citu neparametrisku testu, piemēram, Džonkhīra–Terpstras testu *(Jonckheere-Terpstra)* (27)(28) vai Šērlija testu (29)(30); kopumā tie būtu vēlamāki nekā nelīdzvērtīgās dispersijas t-testi (sk. arī shēmu 6. papildinājumā).

47. Ja ir veikts robežtests un izpildās parametriskās testēšanas procedūras priekšnosacījumi (normālsadalījums, homogenitāte), var izmantot pāru Stjūdenta t-testu, ja ne – Manna–Vitnija U-testa procedūru (31).

EC_x noteikšana

48. Lai aprēķinātu EC_x vērtību, lineārās vai nelineārās regresijas analīzē izmanto katras apstrādes vidējie rādītāji pēc tam, kad ir iegūta atbilstoša devas–atbildreakcijas funkcija. Attiecībā uz tārpu augšanu kā nepārtrauktu reakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot piemērotu regresijas analīzi (32). Kā piemērotas funkcijas bināriem datiem (mirstībai/izdzīvotībai un pēcnācēju skaitam) minamas normālā sigmoīda, logistiskā vai Veibula funkcija, kas satur divus līdz četrus parametrus, no kuriem daži var modelēt arī hormētiskas atbildreakcijas. Ja devas–atbildreakcijas funkcija piemeklēta ar lineāras regresijas analīzi, ar regresijas analīzi būtu jākonstatē būtisks r^2 (determinācijas koeficients) un/vai virziena koeficients, pirms nosaka EC_x, regresijas analīzē atrastajā vienādojumā ievietojot vērtību, kas atbilst x % kontroles vidējā. 95 % ticamības intervālu aprēķina pēc Fīlera *(Fieller)* (citēts Finneja *(Finney)* darbā (18)) vai citām modernām, atbilstošām metodēm.

49. Alternatīvi atbildreakciju modelē kā modeļa parametra procentuālo daļu vai proporciju, kas tiek interpretēta kā kontroles vidējā reakcija. Tādos gadījumos normālo (logistisko, Veibula) sigmoīdo līkni bieži vien viegli pielāgot rezultātiem, izmantojot probita regresijas procedūru (18). Tādos gadījumos svēršanas funkcija jāpielāgo metriskām atbildreakcijām, kā norādījis Kristensens *(Christensen)* (33). Savukārt tad, ja ir novērota hormēze, probita analīze būtu jāaizstāj ar četru parametru logistisko vai Veibula funkciju, kas pielāgota ar nelineāras regresijas procedūru (34). Ja datiem nevar piemeklēt piemērotu devas–atbildreakcijas funkciju, EC_x un tās ticamības intervālu aprēķināšanai var izmantot alternatīvas metodes, piemēram, slīdošos vidējos pēc Tompsona *(Thompson)* (19) un saīsināto Spīrmena–Kerbera metodi (20).

TESTĒŠANAS PĀRSKATS

50. Testēšanas pārskatā jāiekļauj turpmāk norādītā informācija.

▼M6

Testējamā ķīmiskā viela:

— testējamās ķīmiskās vielas, tās partijas, sērijas, *CAS* numura un tīrības pilnīgs apraksts;

— testējamās ķīmiskās vielas īpašības (piemēram, log K_{ow}, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, Henrija konstante (H) un informācija par tās apriti).

Testa organismi:

— izmantotie testa dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu izcelsme un audzēšanas apstākļi;

— testējamo dzīvnieku vecums, lieluma (masas) diapazons.

Testēšanas apstākļi:

— detalizēta informācija par testējamās augsnes sagatavošanu;

— augsnes maksimālā ūdensnoturspēja;

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai augsnē izmantotā paņēmiena apraksts;

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmantoto ķīmisko palīgvielu apraksts;

— attiecīgā gadījumā – detalizēta informācija par izsmidzināšanas aprīkojuma kalibrāciju;

— eksperimenta plāna un procedūras apraksts;

— testēšanas konteineru izmērs un testa augsnes tilpums;

— testēšanas apstākļi: gaismas intensitāte, gaismas un tumsas ciklu ilgums, temperatūra;

— barošanas režīma apraksts; testā izmantotās barības veids un daudzums; barošanas datumi;

— augsnes pH un ūdens saturs testēšanas sākumā un beigās.

Testa rezultāti:

— pieaugušo indivīdu mirstība (%) katrā testēšanas konteinerā pirmo 4 testēšanas nedēļu beigās;

— pieaugušo indivīdu kopējā masa testa sākumā katrā testēšanas konteinerā;

— dzīvo pieaugušo indivīdu ķermeņa svara izmaiņas (% sākotnējā svara) katrā testēšanas konteinerā pēc pirmajās četrām testēšanas nedēļām;

— katrā testēšanas konteinerā izšķīlušos jauno īpatņu skaits testēšanas beigās;

— acīmredzamu vai patoloģisku simptomu vai uzkrītošu uzvedības izmaiņu apraksts;

— rezultāti, kas iegūti ar ķīmisko standartvielu;

— vairošanās LC_{50}, *NOEC* un/vai EC_x (piemēram, EC_{50}, EC_{10}), ja kāds no šiem rādītājiem ir piemērojams, norādot ticamības intervālus un piemeklētā modeļa grafiku, kas izmantots tā aplēšanai, visa rezultātu interpretācijai noderīgā informācija un novērojumi;

— devas un atbildreakcijas sakarības diagramma;

— katra testēšanas konteinera rezultāti.

Jāziņo par atkāpēm no procedūrām, kas aprakstītas šajā testēšanas metodē, un visiem nerakstūrīgiem notikumiem testēšanas laikā.

LITERATŪRA

(1) Jaenicke, J. (1982). 'Eisenia foetida' is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that Eisenia foetida (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 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. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Slieku akūtas toksicitātes tests".

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 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. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) 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.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 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. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (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. Statist. 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, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 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. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šai testēšanas metodei piemērojamas šādas definīcijas.

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

EC_x (ietekmes koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, kas konkrētā ekspozīcijas periodā uz testa organismiem atstāj x % ietekmi salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Piemēram, EC_{50} ir aplēstā koncentrācija, kas noteiktā ekspozīcijas periodā atstāj ietekmi uz testa beigupunktu 50 procentos no eksponētās populācijas. Šajā testā ietekmes koncentrācijas izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību vai kā testējamās ķīmiskās vielas masu uz augsnes laukuma vienību.

LC_0 (neletālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nenonāvē nevienu no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_0 izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LC_{50} (medianālā letālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nonāvē 50 % no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_{50} izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LC_{100} (pilnīgi letālā koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteiktā laika periodā nonāvē 100 % no tai eksponētajiem testa organismiem. Šajā testā LC_{100} izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību.

LOEC (zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija) ir zemākā testējamās vielas koncentrācija ar statistiski nozīmīgu ietekmi ($p < 0,05$). Šajā testā *LOEC* izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas masas un augsnes sausmasas attiecību vai kā testējamās ķīmiskās vielas masas daudzums uz augsnes laukuma vienību. Visām koncentrācijām, kas ir lielākas nekā *LOEC*, normāli vajadzētu būt ietekmei, kas statistiski atšķiras no kontrolgrupas rādītāja. Jebkādas novirzes no iepriekš minētā jāpamato testēšanas pārskatā.

NOEC (nenovērojamās ietekmes koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas augstākā koncentrācija, kas ir tieši zem *LOEC* un kurai nav novērojamas ietekmes. Šajā testā *NOEC* atbilstošajai koncentrācijai attiecīgajā ekspozīcijas periodā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$) salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

Vairošanās ātrums: vairošanās ātrums ir vidējais izšķīlušos jauno tārpu skaits uz pieaugušo skaitu testēšanas laikā.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Augsnes maksimālās ūdensnoturspējas noteikšana

Šī metode ir atzīta par piemērotu augsnes maksimālās ūdensnoturspējas noteikšanai. Tā ir aprakstīta ISO DIS 11268-2 C pielikumā (1).

Ievāciet noteiktu daudzumu (piemēram, 5 g) testējamās augsnes substrāta ar piemērotu parauga paņemšanas ierīci (gliemežcauruli u. c.). Nosedziet caurules apakšu ar filtrpapīra gabalu, uzpildiet ar ūdeni un tad novietojiet to uz statīva ūdens vannā. Caurule pakāpeniski jāiegremdē, līdz ūdens līmenis pārsniedz augsnes virsējo līmeni. Tad tā jāatstāj ūdenī apmēram uz trīs stundām. Tā kā nav iespējams iegūt visu ūdeni, kas uzsūcies augsnes kapilāros, augsnes paraugam būtu divas stundas jāļauj notecēt, novietojot cauruli uz ļoti slapju smalki samaltu kvarca smilšu dobītes nosegtā traukā (lai novērstu izžūšanu). Tad paraugs būtu jānosver un jāizžāvē līdz konstantai masai 105 °C temperatūrā. Ūdensnoturspēju *(WHC)* var aprēķināt šādi:

$$WHC\ (\%\ \text{sausmasas}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kur:

S = ūdens piesātinātais substrāts + caurules masa + filtrpapīra masa

T = tara (caurules masa + filtrpapīra masa)

D = substrāta sausā masa

ATSAUCES

(1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

3. papildinājums

Augsnes PH noteikšana

Turpmākā metode augsnes pH noteikšanai balstās uz aprakstu ISO DIS 10390 ("Augsnes kvalitāte – pH noteikšana" (1)).

Noteiktu augsnes daudzumu vismaz 12 stundas žāvē istabas temperatūrā. Tad vismaz 5 gramus augsnes suspendē piecreiz lielākā tilpumā vai nu 1 M analītiskās tīrības pakāpes kālija hlorīda (KCl), vai 0,01 M analītiskās tīrības pakāpes kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma. Tad suspensiju kārtīgi krata piecas minūtes. Pēc kratīšanas suspensijai ļauj nosēsties vismaz 2 stundas, bet ne ilgāk kā 24 stundas. Tad izmēra šķidrās fāzes pH ar pH mērītāju, kas pirms katra mērījuma kalibrēts, izmantojot atbilstošu buferšķīdumu sēriju (piemēram, pH 4,0 un 7,0).

ATSAUCES

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

4. papildinājums

Kalifornijas sarkanās hibrīdsliekas *(Eisenia fetida)*/mēslu sliekas *(Eisenia andrei)* kultivēšana

Audzēšanu vēlams veikt klimatiskajā skapī 20 °C ± 2 °C. Šādā temperatūrā pie pietiekama barības nodrošinājuma tārpi sasniegs briedumu apmēram 2 līdz 3 mēnešu laikā.

Abas sugas var audzēt daudzu dažādu dzīvnieku mēslos. Ieteicamā audzēšanas vide ir zirgu vai liellopu mēslu un kūdras maisījums attiecībā 50:50. Jāpārbauda, vai govis vai zirgi, no kuriem iegūti mēsli, nav saņēmuši medikamentus vai tikuši ārstēti ar ķīmiskām vielām, piemēram, augšanas stimulantiem, attārpotājiem vai līdzīgiem veterinārām zālēm, kas testēšanas laikā tārpus varētu nevēlami ietekmēt. Ir ieteicams pašiem ievākt govju mēslus no "bioloģiskiem" avotiem, jo pieredze liecina, ka komerciāli pieejamie mēsli, ko izmanto dārza mēslošanā, tārpus var ietekmēt negatīvi. Iegūtā substrāta pH vērtībai jābūt aptuveni 6–7 (koriģē ar kalcija karbonātu), tā jonu vadītspējai jābūt zemai (mazāk nekā 6 mS/cm vai sāls koncentrācija mazāk nekā 0,5 %) un tas nedrīkst būt pārmērīgi piesārņots ar amonjaku vai dzīvnieku urīnu. Substrātam jābūt mitram, bet ne pārāk slapjam. Piemērotas ir vairošanās kastes ar 10 līdz 50 litru tilpumu.

Lai iegūtu standartvecuma un standartlieluma (masas) tārpus, kultivēšanu ieteicams sākt ar kokoniem. Kad kultūra izaudzēta, to uztur, pieaugušos tārpus ievietojot vairošanās kastē ar svaigu substrātu uz 14 līdz 28 dienām, lai nodrošinātu kokonu veidošanos. Tad pieaugušos indivīdus aizvāc, un jaunos īpatņus, kas izšķīlušies no kokoniem, izmanto par pamatu nākamajai kultūrai. Tārpus pastāvīgi baro ar dzīvnieku mēsliem un laiku pa laikam pārvieto svaigā substrātā. Pieredze liecina, ka piemērota barība ir gaisā žāvēti, smalki samalti govju vai zirgu mēsli vai auzu milti. Jāpārbauda, vai govis vai zirgi, no kuriem iegūti mēsli, nav saņēmuši medikamentozu ārstēšanu ar ķīmiskām vielām, piemēram, augšanas stimulantiem, kas varētu nevēlami ietekmēt tārpus ilgstošas kultivēšanas laikā. Tārpus, kas izšķīlušies no kokoniem, testēšanā izmanto, kad tie ir 2 līdz 12 mēnešus veci un uzskatāmi par pieaugušiem.

Tārpus var uzskatīt par veseliem, ja tie pārvietojas pa substrātu, nemēģina to atstāt un pastāvīgi vairojas. Par substrāta izsīkšanu liecina tārpu ļoti lēna pārvietošanās un dzeltens pakaļējais gals. Tādā gadījumā ieteicams pievienot svaigu substrātu un/vai samazināt tārpu biezību.

▼**M6**

5. papildinājums

NO KOKONIEM IZŠĶĪLUŠOS JAUNO TĀRPU SKAITĪŠANAS PAŅĒMIENI

Tārpu šķirošana ar rokām no augsnes substrāta prasa ļoti daudz laika. Tāpēc iesaka divas alternatīvas metodes.

a) Testēšanas konteinerus ievieto ūdens vannā, kur sākotnēji temperatūra ir 40 °C, bet vēlāk to paaugstina līdz 60 °C. Pēc apmēram 20 minūtēm jaunajiem tārpiem jāparādās augsnes virspusē, no kurienes tos var viegli paņemt un saskaitīt.

b) Testēšanas augsni var izskalot caur sietu, izmantojot metodi, ko izstrādājis van Gestels *(van Gestel)* kopā ar kolēģiem, (1) pieņemot, ka kūdra un mēsli vai augsnei pievienotie auzu milti tikuši smalki samalti. Vienu virs otra novieto divus sietus (acu izmērs – 0,5 mm; sietu diametrs – 30 cm). Testēšanas konteinera saturu ar spēcīgu krāna ūdens strūklu izskalo caur sietiem, jaunos tārpus un kokonus pārsvarā atstājot augšējā sietā. Ir svarīgi piebilst, ka šīs procedūras laikā visa augšējā sieta virsma jāuztur slapja, lai jaunie tārpi peldētu ūdens slānī un nevarētu izkļūt caur sieta porām. Vislabākos rezultātus var panākt, izmantojot dušas uzgali.

Kad viss augsnes substrāts ir izskalots caur sietu, jaunos īpatņus un kokonus no augšējā sieta var ieskalot bļodā. Tad bļodas saturu atstāj nostāvēties, lai tukšie kokoni peldētu pa ūdens virsu, bet pilnie kokoni un jaunie tārpi nogrimtu apakšdaļā. Stāvošo ūdeni tad var noliet un jaunos tārpus un kūniņas pārnest uz Petri plati ar nedaudz ūdens. Tārpus izvākt skaitīšanai var ar adatu vai pinceti.

Pieredze liecina, ka jauno tārpu ekstrakcijai labāk piemērota ir a) metode, jo jaunie tārpi var izkļūt pat caur 0,5 mm sīkiem caurumiņiem.

Vienmēr jānosaka, cik efektīva ir metode, ko izmanto, lai tārpus (un kokonus, ja iespējams) izvāktu no augsnes substrāta. Ja jaunos īpatņus šķiro ar rokām, ieteicams šo procedūru visiem paraugiem veikt divreiz.

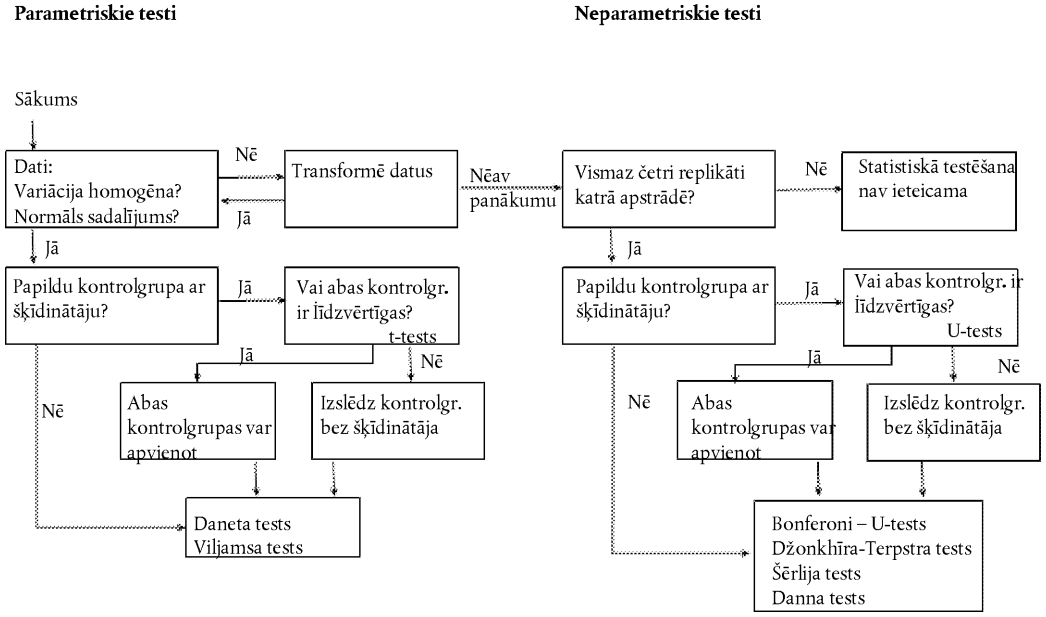
ATSAUCES

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼M6

6. papildinājums

Pārskats par datu statistisku novērtēšanu (*NOEC* noteikšana)



▼M6

C.34. **ANAEROBO BAKTĒRIJU AKTIVITĀTES INHIBĒŠANĀS NOTEIKŠANA PĒC TĀ, KĀ SAMAZINĀS GĀZES IZDALĪŠANĀS NO ANAEROBI BIONOĀRDOŠĀM (NOTEKŪDEŅU) DŪŅĀM**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 224 (2007. gads). Ķīmiskās vielas, kas nonāk ūdensvidē, iet cauri gan anaerobām, gan aerobām zonām, kur tās var noārdīties un/vai inhibēt baktēriju aktivitāti; dažos gadījumos tās anaerobās zonās var netraucēti saglabāties gadu desmitiem vai ilgāk. Notekūdeņu apstrādē pirmais posms – primārā nosēšanās – virspusējā šķidrumā ir aerobs un apakšā esošajās dūņās – anaerobs. Tam seko otrais posms, kurā aerobā zona ir aktīvo dūņu aerācijas baseinā, savukārt anaerobā zona – sekundārās nostādināšanas tvertnes apakšā esošās dūņās. Abos posmos dūņas parasti pakļauj anaerobai apstrādei, kurā rodas metāns un oglekļa dioksīds, ko parasti izmanto, lai ražotu elektrību. Plašākā vidē ķīmiskās vielas, kas nonāk līču, estuāru un jūras sedimentos, visticamāk, nenoteiktu laiku paliks šajās anaerobajās zonās, ja vien tās nav bionoārdāmas. Šajās zonās vislielākajā daudzumā nonāks ķīmiskās vielas ar attiecīgām fizikālām īpašībām, piemēram, nelielu šķīdību ūdenī, augstu adsorbēšanos uz suspendētām cietvielu daļiņām, kā arī nespēju tikt bioloģiski aerobi noārdītām.

2. Lai gan vēlams, lai vidē nonākošas ķīmiskās vielas būtu bionoārdāmas gan aerobos, gan anaerobos apstākļos, ir būtiski, lai ne pirmajos, ne otrajos šādas ķīmiskās vielas neinhibētu mikroorganismu darbību. Apvienotajā Karalistē ir bijuši vairāki gadījumi, kur metāna ražošana pilnīgi inhibējusies, un to izraisījis, piemēram, rūpnieciskajos notekūdeņos esošais pentahlorfenols, kura dēļ inhibējušās dūņas ar ļoti augstām izmaksām nācies no bioreaktoriem transportēt uz "drošām" vietām un tās aizstāt ar veselīgām bionoārdošām dūņām no tuvējiem kompleksiem. Taču daudzos gadījumos mazāk smagus bioreaktoru traucējumus izraisījušas vairākas citas ķīmiskās vielas, arī alifātiskie halogēnūdeņraži (ķīmiskā tīrīšana) un deterģenti, kuri būtiski mazinājuši bioreaktoru efektivitāti.

3. Tikai viena testēšanas metode, C.11 (1), kas saistīta ar bakteriālās aktivitātes inhibēšanos (aktīvo dūņu respirācija), dod iespēju novērtēt, kā testējamās ķīmiskās vielas ietekmē skābekļa uzņemšanas ātrumu substrāta klātbūtnē. Metodi plaši izmanto, lai agrīni noteiktu ķīmisko vielu iespējamo kaitīgo ietekmi uz notekūdeņu aerobo apstrādi, kā arī lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas neinhibējošās koncentrācijas, ko izmantot dažādajos bionoārdāmības testos. Ar testēšanas metodi C.43 (2) var tikai ierobežoti noteikt testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti attiecībā uz to, cik gāzes producē anaerobās dūņas, kas atšķaidītas līdz vienai desmitdaļai no to normālās cietvielu daļiņu koncentrācijas, lai nodrošinātu nepieciešamo precizitāti procentuālās bionoārdīšanās novērtēšanā. Tā kā atšķaidītas dūņas var būt jutīgākas pret inhibējošām ķīmiskajām vielām, ISO grupa nolēma izstrādāt metodi, kurā izmanto neatšķaidītas dūņas. Tika pārbaudīti vismaz trīs testi (no Dānijas, Vācijas un Apvienotās Karalistes) un beigās tika sagatavoti divi ISO standarti – viens, ISO 13 641-1 (3), attiecībā uz neatšķaidītām dūņām un otrs, ISO 13 641-2 (4), attiecībā uz simtkārtīgi atšķaidītām dūņām – lai reprezentētu sašķidrinātas dūņas un sedimentus ar mazskaitlīgām baktēriju populācijām. Abas metodes tika pārbaudītas starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (5); 1. daļa tika apstiprināta kā pieņemams standarts, bet 2. daļa izraisīja domstarpības. Apvienotās Karalistes zinātnieki uzskatīja, ka metode vēl jāpēta, jo liela daļa dalībnieku ziņoja, ka gāze veidojas nedaudz vai vispār neveidojas, daļēji tāpēc, ka gāzestelpas procents optimālai jutībai bija pārāk liels (75 %).

4. Senākā pētījumā Apvienotajā Karalistē (6)(7) aprakstīta manometriska metode, kurā 500 ml kolbās izmantoja neatšķaidītas bionoārdošas dūņas, kā arī neapstrādātas notekūdeņu dūņas – par substrātu; sistēma bija neērta un neapstrādātās dūņas smakoja. Vēlāk Vilsons *(Wilson)* ar kolēģiem sekmīgi lietoja kompaktāku un ērtāku Šeltona un Tiedjē *(Shelton, Tiedje)* (8) aparātu, ko izstrādāja Batersbijs *(Battersby)* un Vilsons (9). Kavahara

▼M6

(Kawahara) ar kolēģiem (11) laboratorijā sekmīgi sagatavoja vairākas standartizētas dūņas izmantošanai anaerobiskās bionoārdāmības un inhibēšanās testos ar vairākām ķīmiskajām vielām. Tika aizstāts arī substrāts, neapstrādātu dūņu vietā testu veicot ar simtkārtīgi atšķaidītām anaerobajām dūņām vai ar sašķidrinātām dūņām, sedimentiem u. tml., kam ir zema bakteriālā aktivitāte.

5. Šī metode var sniegt informāciju, kas var noderēt, lai paredzētu iespējamo testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz gāzes producēšanos anaerobajos bioreaktoros. Tomēr tikai ilgāka testēšana, kas precīzāk simulē darbojošos bioreaktorus, var parādīt, vai mikroorganismi testējamajai ķīmiskajai vielai var adaptēties, vai arī ķīmiskās vielas, visticamāk, adsorbēsies un, dūņās adsorbējušās, toksiskas koncentrācijas sasniegs ilgākā laika periodā, nekā pieļauj šis tests.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

6. Alikvotas daļas no anaerobi bionoārdošu dūņu (kopējā cietvielu daļiņu koncentrācija: 20 līdz 40 g/l) un noārdāma substrāta šķīduma maisījuma noslēgtos traukos atsevišķi un vienlaikus ar vairākām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām inkubē līdz trim dienām. Kad pudelēs palielinājies spiediens (Pa), izmēra, kāds daudzums gāzes (metāna un oglekļa dioksīda) radies. Gāzes rašanās procentuālo inhibēšanos, ko izraisījusi testējamā ķīmiskā viela dažādās koncentrācijās, aprēķina pēc daudzumiem, kas radušies attiecīgajās testēšanas un kontroles pudelēs. EC_{50} un citas iedarbīgās koncentrācijas aprēķina pēc diagrammām, kur norādīta inhibēšanās procentuālā atkarība no testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas, vai biežāk pēc logaritmiskās sakarības.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

7. Testējamā ķīmiskā viela jāizmanto tīrākajā pieejamajā formā, jo dažu testējamo ķīmisko vielu, piemēram, hlorfenolu, piemaisījumi var būt daudz toksiskāki nekā pati testējamā ķīmiskā viela. Tomēr jāapsver, vai ķīmiskās vielas nav jātestē tādā formā, kādā tās ražo vai dara komerciāli pieejamas. Parasti nav ieteicams izmantot gatavus līdzekļus, tomēr attiecībā mazšķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām to izmantošana var būt lietderīga. Pieejamām jābūt šādām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām: šķīdība ūdenī un dažos organiskajos šķīdinātājos, tvaika spiediens, adsorbcijas koeficients, hidrolīze un bionoārdāmība anaerobiskos apstākļos.

METODES PIEMĒROTĪBA

8. Tests ir piemērojams ķīmiskajām vielām, kas šķīst vai nešķīst ūdenī, tostarp gaistošām ķīmiskajām vielām. Tomēr ar ūdenī mazšķīstošiem (sk. atsauci (12)) un viegli gaistošiem materiāliem jāstrādā īpaši uzmanīgi. Turklāt var izmantot arī inokulātus no citām anaerobām vidēm, piemēram, dūņām, papildinātām augsnēm un sedimentiem. Anaerobas baktēriju sistēmas, kas jau iepriekš bijušas eksponētas toksiskām ķīmiskām vielām, var pielāgot tam, lai tās saglabātu aktivitāti ksenobiotisku ķīmisko vielu klātbūtnē. No pielāgotām baktēriju sistēmām iegūti inokulāti var uzrādīt augstāku toleranci pret testējamām ķīmiskajām vielām salīdzinājumā ar inokulātu, kas iegūts no nepielāgotām sistēmām.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

9. Lai pārbaudītu procedūru, testē ķīmisko standartvielu, parastajā testa gaitā paralēli iekārtojot piemērotus traukus; ir pierādīts, ka anaerobo gāzes producēšanos, skābekļa patēriņu aktīvajās dūņās un citas bioķīmiskās reakcijas pastāvīgi inhibē 3,5-dihlorfenols. Divas citas ķīmiskās vielas, konkrētāk – metilēna bis-tiocianāts un pentahlorfenols – ir uzrādījušas, ka metāna producēšanos inhibē vēl vairāk nekā 3,5-dihlorfenols, taču ar tām iegūtie rezultāti nav validēti. Pentahlorfenols nav ieteicams, jo tīrā formā tas nav viegli pieejams.

▼M6

REZULTĀTU REPRODUCĒjamība

10. Laboratorijās, kas piedalījās starptautiskajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (5), 3,5-dihlorfenola un 2-brometāna sulfonskābes EC_{50} vērtību reproducējamība bija tikai mērena. (Pirmajai intervāls bija no 32 mg/l līdz 502 mg/l un otrajai – 220–2 190 mg/l.)

Laboratoriju skaits	Kā mg/l			Kā mg/g dūņu		
	Vidējā vērtība	Standartnovirze	Variācijas koeficients (%)	Vidējā vērtība	Standartnovirze	Variācijas koeficients (%)
	3, 5-dihlorfenols					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-brometāna sulfonskābe					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50} dati no starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas – neatšķaidītas dūņas

11. Augstais variācijas koeficients laboratoriju vidū lielā mērā atspoguļo dūņu mikroorganismu jutīguma atšķirības, ko radījusi iepriekšēja eksponētība vai neeksponētība testējamai ķīmiskajai vielai vai tai ķīmiski radniecīgām vielām. Precizitāte, ar kādu, pamatojoties uz dūņu koncentrāciju, tika noteikta EC_{50} vērtība, tikai nedaudz pārsniedza "tilpuma" vērtību (mg/l). Trīs laboratorijas, kas ziņoja par savu 3,5-dihlorfenola EC_{50} vērtību precizitāti, uzrādīja daudz zemākus variācijas koeficientus (attiecīgi 22,9 un 18 % EC_{50} mg/g) nekā visu desmit laboratoriju vidējās vērtības. Atsevišķās vidējās vērtības trijām laboratorijām bija attiecīgi 3,1, 3,2 un 2,8 mg/g. Zemākais pieņemamais variācijas koeficients laboratoriju vidū salīdzinājumā ar daudz augstākajiem starplaboratoriju vērtību koeficientiem (attiecīgi 9–22 % salīdzinājumā ar 92 %) norāda, ka atsevišķu dūņu īpašības būtiski atšķiras.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

12. Nepieciešams laboratorijas standarta aprīkojums un turpmāk norādītais:

a) inkubators – dzirksteļdrošs un kontrolēts 35 °C ± 2 °C temperatūrā;

b) spiedienizturīgi stikla testēšanas trauki ar piemērotu nominālo tilpumu ([1]), katrs ar gāznecaurlaidīgu apvalkotu blīvi, kas spēj izturēt apmēram 2 bārus jeb 2×10^5 Pa (apvalkošanai izmantojiet, piemēram, PTFE = politetrafluoretēnu). Ir ieteicamas stikla seruma pudeles ar nominālo tilpumu 125 ml un faktisko tilpumu ap 160 ml, noslēgtas ar seruma blīvēm ([2]) un aizlocītiem alumīnija gredzeniem; bet var lietot pudeles ar kopējo tilpumu no 0,1 līdz 1 litram;

([1]) Ieteicamais izmērs ir no 0,1 līdz 1 litram.

([2]) Ieteicams izmantot gāznecaurlaidīgu silikona blīvi. Papildus ieteicams pārbaudīt vāciņu gāznecaurlaidīgumu, jo īpaši butilgumijas blīvi, jo vairākas komerciāli pieejamas blīves nav pietiekami gāznecaurlaidīgas attiecībā uz metānu un dažas blīves testēšanas apstākļos nesaglabā necaurlaidību, ja tās caurdur ar adatu.

— Ir ieteicamas gāznecaurlaidīgas, apvalkotas blīves, kas jāizmanto gaistošām ķīmiskām vielām (dažas komerciālās blīves ir salīdzinoši plānas (mazāk nekā 0,5 cm) un nesaglabā gāznecaurlaidīgumu pēc caurduršanas ar šļirces adatu).

— Butilgumijas blīves (apmēram 1 cm biezas) ir ieteicamas, ja testējamās vielas nav gaistošas (parasti tās pēc caurduršanas saglabā gāznecaurlaidīgumu).

— Pirms testēšanas ir ieteicams rūpīgi pārbaudīt blīvju spēju pēc caurduršanas saglabāt gāznecaurlaidīgumu.

▼M6

c) precīzs manometrs ([1]) un pierīkota adata;

kopējā gāzes producēšanās (metāns kopā ar oglekļa dioksīdu), mērīta ar manometru, kas pielāgots tā, lai mērītu radušos gāzi un laistu to cauri. Piemērots instruments ir, piemēram, precīzs manuāls manometrs, kas savienots ar šļirces adatu; lieko spiedienu atbrīvo trīsvirzienu gāznecaurlaidīgs vārsts (1. papildinājums). Spiediena sensora caurules un vārsta iekšējo tilpumu ir nepieciešams uzturēt tik zemu, cik vien iespējams, lai aprīkojuma tilpuma neievērošanas dēļ ieviesušās kļūdas būtu nebūtiskas.

d) izolēti konteineri bionoārdošo dūņu transportēšanai;

e) trīsvirzienu spiediena vārstii

f) siets ar 1 mm kvadrātveida acīm;

g) rezervuārs bionoārdošajām dūņām; 5 litru tilpuma stikla vai ļoti blīva polietilēna pudele, kas aprīkota ar maisītāju un ierīcēm, kuri nodrošina slāpekļa gāzes (sk. 13. punktu) plūšanu caur brīvo tilpumu;

h) membrānu filtri (0,2 μm) substrāta sterilizēšanai;

i) mikrošļirces, ar kurām veido gāznecaurlaidīgu savienojumu starp spiediena sensoru (sk. 12. punkta c) apakšpunktu) un pudeļu brīvo tilpumu (sk. 12. punkta b) apakšpunktu), kā arī pudelēs ievada nešķīstošus, šķidrus testēšanas materiālus;

j) bokss ar cimdiem– nav obligāts, bet ieteicams, ar viegli pozitīvu slāpekļa spiedienu.

Reaģenti

13. Visā testēšanā jāizmanto analītiski tīri reaģenti. Visā testēšanā jāizmanto augstas tīrības pakāpes slāpekļa gāze ar skābekļa piejaukumu mazāk nekā 5 μl/l.

Ūdens

14. Ja kādā posmā ir nepieciešama atšķaidīšana, izmanto dejonizētu, iepriekš atgaisotu ūdeni. Šo ūdeni analītiski kontrolēt nav vajadzīgs, bet pārliecinieties, ka dejonizācijas aparātu regulāri pārbauda. Izmanto dejonizētu ūdeni arī izejšķīdumu pagatavošanai. Pirms anaerobiskā inokulāta pievienošanas jebkuram šķīdumam vai testējamā materiāla atšķaidīšanas pārliecinieties, ka tas nesatur skābekli. To var izdarīt, cauri atšķaidīšanas ūdenim (vai cauri atšķaidījumiem) vienu stundu pirms inokulāta pievienošanas laižot slāpekļa gāzi vai atšķaidīšanas ūdeni uzsildot līdz vārīšanās punktam un bezskābekļa atmosfērā atvēsinot līdz istabas temperatūrai.

Bionoārdītās dūņas

15. Bioreaktora notekūdeņu attīrīšanas stacijā vai no laboratorijas bioreaktora, kas pārstrādā galvenokārt sadzīves notekūdeņus, ievāc aktīvas bionoārdošas dūņas. Praktisku informāciju par dūņām no laboratorijas bioreaktora var atrast avotos (11). Ja ir paredzēts izmantot pielāgotu inokulātu, var apsvērt, vai neizmantot bionoārdošas dūņas no rūpniecisko notekūdeņu attīrīšanas stacijas. Dūņu savākšanai izmanto pudeles ar platu kakliņu, kas izgatavotas no augsta blīvuma polietilēna vai līdzīgiem materiāliem, kuri var izplesties. Paraugu pudeles uzpilda līdz līmenim 1 cm zem pudeles augšas, cieši tās

([1]) Manometrs jālieto un regulāri jākalibrē atbilstoši ražotāja norādījumiem. Ja izmanto norādītās kvalitātes manometru, piemēram, ar tērauda membrānas kapsulu, kalibrēšana laboratorijā nav nepieciešama. Tas ar ieteicamiem starplaikiem jākalibrē licenzētā institūtā. Kalibrācijas precizitāti var pārbaudīt laboratorijā ar vienu mērījumu 1×10^5 Pa spiedienā, salīdzinot ar manometru ar mehānisko skalu. Ja šis mērījums ir veikts pareizi, linearitāte nemainīsies. Ja izmanto citas mērījumu ierīces (bez ražotāja sertificētas kalibrācijas), ir ieteicama regulāra pārveidošana kopējā intervālā (2. papildinājums).

▼M6

noslēdz, vēlams, ar drošības ventili (sk. 12. punkta e) apakšpunktu), un ievieto izolētos konteineros (12. punkta d) apakšpunkts), lai samazinātu temperatūras šoku līdz brīdim, kad tās ievieto inkubatorā, kurā uztur 35 °C ± 2 °C temperatūru. Atverot pudeles, uzmanīgi paver plombu vai ar trīsvirzienu spiediena atbrīvošanas vārstu (12. punkta e) apakšpunkts) panāk, ka atbrīvo lieko spiedienu. Dūņas vēlams izmantot dažās pirmajās stundās pēc savākšanas, pretējā gadījumā tās zem slāpekļa brīvajā tilpumā 35 °C ± 2 °C temperatūrā var glabāt līdz trim dienām, šādi aktivitātei zūdot tikai nedaudz.

Brīdinājums. Bionoārdošas dūņas rada uzliesmojošas gāzes, kas ir ugunsnedrošas un sprādzienbīstamas; tās satur arī potenciāli patogēnus mikroorganismus, tāpēc darbā ar dūņām ievēro attiecīgus piesardzības pasākumus. Drošības apsvērumu dēļ dūņu ievākšanai neizmanto stikla traukus.

Inokulāts

16. Neilgi pirms izmantošanas dūņas uzmanīgi samaisa un caur sietu ar 1 mm^2 acīm (12. punkta f) apakšpunkts) ielaiž piemērotā pudelē (12. punkta g) apakšpunkts), caur tās brīvo tilpumu laižot slāpekli. Paglabā paraugu kopējo sauso cietvielu daļiņu koncentrācijas mērīšanai (sk., piemēram, ISO 11 923 (13) vai līdzvērtīgu ES standartu). Ieteicams izmantot neatšķaidītas dūņas. Cietvielu daļiņu koncentrācija parasti ir no 2 līdz 4 % (svars/tilpums). Pārbauda dūņu pH vērtību un, ja nepieciešams, to koriģē līdz 7 ± 0,5.

Testēšanas substrāts

17. Dejonizētā ūdenī izšķīdina 10 g buljona ar barības vielām (piemēram, *Oxoid*), 10 g rauga ekstrakta un 10 g D-glikozes un iegūto šķīdumu atšķaida līdz 100 ml. Sterilizē ar filtrēšanu caur 0,2 μm membrānas filtru (12. punkta h) apakšpunkts) un izmanto uzreiz vai uzglabā 4 °C temperatūrā ne ilgāk kā vienu dienu.

Testējamā ķīmiskā viela

18. Katrai ūdenī šķīstošai testējamajai ķīmiskajai vielai sagatavo atsevišķu izejšķīdumu, kas satur, piemēram, 10 g/l ķīmiskās vielas bezskābekļa ūdens atšķaidījumā (14. punkts). Ar attiecīgiem šo izejšķīdumu tilpumiem sagatavo reakcijas maisījumus ar pakāpeniskas secības koncentrācijām. Alternatīvi ar katru izejšķīdumu sagatavo atšķaidījumu rindu tā, lai testēšanas pudelēs attiecībā uz katru nepieciešamo beigu koncentrāciju būtu pievienojams vienāds tilpums. Ja nepieciešams, izejšķīdumu pH pielāgo līdz 7 ± 0,2.

19. Attiecībā uz testējamām ķīmiskajām vielām, kas pietiekami nešķīst ūdenī, sk. ISO 10 634 (12) vai līdzvērtīgu ES standartu. Ja nepieciešams organisks šķīdinātājs, neizmantojiet tādus šķīdinātājus kā hloroforms vai oglekļa tetrahlorīds, kas, kā zināms, ir spēcīgi metāna producēšanās inhibitori. Attiecīgas koncentrācijas gaistošā šķīdinātājā, piemēram, acetonā vai dietilēterī, sagatavo ūdenī nešķīstošas ķīmiskās vielas šķīdumu. Tukšajās testēšanas pudelēs vajadzīgajos tilpumos pievieno šķīdinātāja šķīdumu (sk. 12. punkta b) apakšpunktu) un pirms dūņu pievienošanas ļauj šķīdinātājam iztvaikot. Citu apstrāžu gadījumā izmanto ISO 10 634 (12) vai līdzvērtīgu ES standartu, taču ņem vērā, ka jebkādas emulsiju gatavošanā izmantotas virsmaktīvas vielas var inhibēt anaerobo gāzes producēšanos. Ja uzskata, ka organisko šķīdinātāju un emulgantu klātbūtne var radīt artefaktus, testējamo ķīmisko vielu kā pulveri vai šķidrumu var pievienot tieši testējamajam maisījumam. Gaistošas ķīmiskās vielas vai ūdenī nešķīstošas šķidras testējamās ķīmiskās vielas var ar mikrošļircēm injicēt jau uzsētajās seruma pudelēs (sk. 12. punkta i) apakšpunktu).

▼M6

20. Testējamo ķīmisko vielu pudelēs pievieno tā, lai izveidotu ģeometrisku koncentrāciju rindu, piemēram, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l un 15,6 mg/l. Ja no datiem par līdzīgām ķīmiskajām vielām nav zināms toksicitātes intervāls, vispirms veic diapazona noteikšanas provizorisko testu ar 1 000 mg/l, 100 mg/l un 10 mg/l koncentrācijām, lai noskaidrotu attiecīgo intervālu.

Ķīmiskā standartviela

21. Sagatavo 3,5-dihlorfenola šķīdumu ūdenī (10 g/l), cietajai vielai pakāpeniski pievienojot minimālo daudzumu nātrija hidroksīda šķīduma (5 mol/l) un to kratot, līdz tā pilnībā izšķīdusi. Tad vajadzīgajā tilpumā pievieno bezskābekļa atšķaidīšanas ūdeni (14. punkts); šķīšanu var veicināt apstrāde ar ultraskaņu. Var izmantot citas ķīmiskās standartvielas, ja ar tām vismaz trīs testos ar dažādiem inokulātiem (dažādi avoti vai dažādi savākšanas laiki) ir iegūts EC_{50} vidējais diapazons.

TRAUCĒJUMI/KĻŪDAS

22. Domājams, ka dažas dūņu sastāvdaļas ar potenciālajiem inhibitoriem var reaģēt, padarot tos mikroorganismiem nepieejamus, tādējādi inhibēšanos mazinot vai pilnīgi novēršot. Turklāt, ja dūņas jau satur ķīmisko vielu ar inhibējošu iedarbību, šīs ķīmiskās vielas testēšanā tiks iegūti kļūdaini rezultāti. Bez šīm iespējamībām ir vairāki zināmi faktori, kas var novest pie aplamiem rezultātiem. Tie ir norādīti 3. papildinājumā kopā ar metodēm, kas dos iespēju kļūdas novērst vai vismaz samazināt.

TESTA PROCEDŪRA

23. Nepieciešamo paraugu skaits ir atkarīgs no tā, cik liela precizitātes pakāpe attiecībā uz inhibēšanās rādītājiem vajadzīga. Ja pudeļu plombas testēšanas laikā ir pietiekami gāznecaurlaidīgas, pietiks tikai ar vienu testēšanas pudeļu sēriju (vismaz trīs eksemplāros) visās nepieciešamajās koncentrācijās. Līdzīgā kārtā sagatavo vienu pudeļu sēriju ar ķīmisko standartvielu un vienu kontrolkomplektu. Tomēr, ja pudeļu plombas iztur tikai vienu vai dažus dūrienus, katram intervālam (t), par kuru jāiegūst rezultāti, sagatavo testēšanas pudeļu sēriju (piemēram, trīs eksemplāros) visās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijās. Līdzīgā kārtā sagatavo "t" pudeļu sērijas ķīmiskajai standartvielai un kontrolēm.

24. Ir ieteicams izmantot boksu ar cimdiem (12. j) punkts). Vismaz 30 minūtes pirms testēšanas sākšanas caur boksu ar cimdiem, kurā ir viss nepieciešamais aprīkojums, palaiž slāpekļa gāzes plūsmu. Gādājiet, ka laikā, kad notiek darbs ar pudelēm un to noslēgšana, dūņu temperatūra ir 35 °C ± 2 °C robežās.

Priekštestēšana

25. Ja dūņu aktivitāte nav zināma, ieteicams veikt priekštestēšanu. Sagatavo kontrolparaugus ar cietvielu daļiņu koncentrāciju, piemēram, 10 g/l, 20 g/l un 40 g/l) un substrātu, bet bez testējamajām ķīmiskajām vielām. Izmanto arī dažādus reakcijas maisījuma tilpumus, lai iegūtu trīs vai četras dažādas brīvā tilpuma un šķidruma slāņa tilpuma attiecības. Pēc iegūtajiem datiem par dažādos laika intervālos producētās gāzes tilpumu [izraugās] vispiemērotākos apstākļus, kas ļauj veikt divus mērījums dienā, iegūt nozīmīgus gāzes tilpumus un katru dienu atbrīvot spiedienu pie optimālas jutības [1] un bez sprādziena riska.

Testējamo ķīmisko vielu pievienošana

26. Ūdenī šķīstošu testējamo ķīmisko vielu ūdens šķīdumu (18. punkts) iepilda tukšās testēšanas pudelēs (12. punkta b) apakšpunkts). Katram koncentrāciju intervālam izmanto vismaz trīs pudeļu komplektus (20. punkts). Nešķīstošu vai mazšķīstošu testējamo ķīmisko vielu gadījumā tukšās pudelēs ar mikrošļirci injicē šo vielu šķīdumus organiskajos šķīdinātājos, lai iegūtu replikātu

[1] Tas attiecas uz eksperimentālo plānu un eksperimentāliem apstākļiem, kuros radušās gāzes tilpumu var aprēķināt ar pieļaujamu kļūdas pakāpi – no tukšiem kontrolparaugiem un no traukiem, kuri liecina par 70–80 % inhibēšanos.

▼M6

komplektus katrai no piecām testējamās vielas koncentrācijām. Šķīdinātāju iztvaicē, pāri šķīdumu virsmai testēšanas pudelēs laižot slāpekļa gāzes strūklu. Alternatīva ir nešķīstošas, cietas ķīmiskās vielas iesvērt un zināmus daudzumus pievienot tieši testēšanas pudelēs.

27. Ja nešķīstošas un ūdenī vāji šķīstošas šķidras testējamās ķīmiskās vielas nepievieno ar šķīdinātāja starpniecību, tās pēc tam, kad ir pievienots inokulāts un testējamais substrāts (sk. 30. punktu), ar mikrošļirci pievieno tieši testēšanas pudelēs. Tādā pašā veidā var pievienot gaistošas testējamās ķīmiskās vielas.

Inokulāta un substrāta pievienošana

28. Attiecīgu tilpumu caur sietu izlaistu bionoārdošu dūņu (sk. 16. punktu) samaisa 5 litru pudelē (12. punkta g) apakšpunkts), vienlaikus caur tās brīvo tilpumu laižot slāpekļa gāzes strūklu. Testēšanas pudeles, kas satur ūdens šķīdumus vai testējamo ķīmisko vielu šķīdumus iztvaicētos šķīdinātājos, apmēram divas minūtes skalo ar slāpekļa gāzes strūklu, lai tās atgaisotu. Izmantojot pipeti ar platu galu vai mērcilindru, pa testēšanas pudelēm sadala vienādus daudzumus (piemēram, 100 ml) labi sajauktu dūņu. Ir svarīgi pipeti vienā piegājienā uzpildīt tieši līdz vajadzīgajam dūņu tilpumam, jo dūņu cietvielu daļiņas viegli nogulsnējas. Ja iesūc vairāk, pipeti iztukšo un darbību sāk no jauna.

29. Tad, kamēr vēl cauri plūst slāpeklis, pietiekamā daudzumā pievieno substrāta šķīdumu (17. punkts), lai barības vielu buljona, rauga ekstrakta un D-glikozes koncentrācija maisījumā katram būtu 2 g/l. Šis ir testēšanas sēriju piemērs.

Galīgā testējamo ķīmisko vielu masas koncentrācija testēšanas pudelēs (mg/l)	Testējamo ķīmisko vielu tilpums (ml)		Reaģenti un vide (ml)		
	Izejšķīdums (a) < 10 g/l 18. punkts	Izejšķīdums (b) < 1 g/l 18. punkts	Atšķaidīšanas ūdens 14. punkts	Inokulāts 16. punkts	Substrāts 17. punkts
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

Kopējais pudeles tilpums = 160 ml Šķidruma tilpums = 103 ml
Gāzes tilpums = 57 ml jeb 35,6 % kopējā tilpuma

30. Līdzīgi ar slāpekļa gāzi pietiekamā skaitā izskalo tukšas testēšanas pudeles, lai atbrīvotos no jebkādām gaistošām un nešķīstošām šķidrām testējamām ķīmiskajām vielām (sk. 27. punktu).

▼M6

Kontrolparaugi un ķīmiskā standartviela

31. Sagatavo vismaz trīs identisku pudeļu komplektus, kuras satur tikai dūņas un substrātu: tie būs kontrolparaugi. Sagatavo papildu replikātu pudeles, kas satur dūņas un substrātu, kā arī pietiekami daudz ķīmiskās standartvielas 3,5-dihlorfenola (21. punkts) izejšķīduma, lai iegūtu galīgo koncentrāciju 150 mg/l. Šī koncentrācija gāzes producēšanos inhibēs par apmēram 50 %. Alternatīvi nosaka ķīmiskās standartvielas koncentrāciju intervālu. Papildu pH mērījumiem sagatavo četras pudeles, kas satur dūņas, atskābekļotu ūdeni un substrātu. Divās pudelēs pievieno testējamo ķīmisko vielu augstākajā testējamajā koncentrācijā un atlikušajās divās pudelēs pievieno atskābekļotu ūdeni.

32. Nodrošiniet, ka visas pudeles – ar testējamo ķīmisko vielu un ķīmisko standartvielu, kā arī kontrolparaugi – satur vienādu šķidruma tilpumu (V_R); ja nepieciešams, pievieno atskābekļotu, dejonizētu ūdeni (14. punkts), lai kompensētu trūkstošo tilpumu. Brīvajam tilpumam jābūt 10 % līdz 40 % pudeles tilpuma, faktisko vērtību izraugās pēc priekštestēšanā iegūtajiem datiem. Pēc visu sastāvdaļu pievienošanas pudelēm noņem adatu, caur kuru pieplūst gāze, un katru pudeli noslēdz ar gumijas aizbāzni un alumīnija uzmavu (12.punkta b) apakšpunkts), aizbāzni samitrinot ar pilienu dejonizēta ūdens, lai atvieglotu tā ievietošanu. Pudeļu saturu sajauc, tās sakratot.

Pudeļu inkubēšana

33. Pudeles pārvieto uz inkubatoru ar termostatisku regulāciju, vēlams tādu, kas ir aprīkots ar kratīšanas ierīci, un uztur nemainīgu temperatūru 35 °C ± 2 °C. Pudeles inkubē tumsā. Apmēram pēc vienas stundas spiedienu pudelēs izlīdzina ar atmosfēras spiedienu, pēc kārtas caur katras pudeles plombu izdurot manometram pieslēgtu šļirces adatu (12. punkta c) apakšpunkts), atverot vārstu, līdz manometrs rāda nulli, un beidzot vārstu aizverot. Adata jāievieto apmēram 45 °C leņķī, lai novērstu gāzes noplūdi no pudelēm. Ja pudeles inkubē bez kratīšanas ierīces, tās kopējā inkubācijas perioda laikā divas reizes dienā manuāli sakrata, lai sistēmu līdzsvarotu. Pudeles inkubē un apgriež, lai gāze nekādi nezustu caur blīvi. Tomēr inkubēšana nav piemērota gadījumos, kur nešķīstošas testējamās ķīmiskās vielas var pielipt pudeles apakšdaļai.

Spiediena mērīšana

34. Kad temperatūra pudelēs ir sasniegusi 35 °C ± 2 °C, izmēra un reģistrē sastāva pH divās no četrām šim mērķim sagatavotajām pudelēm un to saturu izlej; atlikušās pudeles turpina tumsā inkubēt. Turpmākajās 48 līdz 72 stundās pH pudelēs mēra un reģistrē divreiz dienā, caur katras pudeles plombu manometrā ievietojot adatu un starp mērījumiem adatu izžāvējot. Laikā, kad notiek mērīšana, kas jāveic iespējami ātri, visas pudeles daļas tur inkubācijas temperatūrā. Spiediena lasījumiem ļauj stabilizēties un tos pieraksta. Tad atver vārstu ventilācijai un, kad spiediena rādījums ir nulle, to aizver. No pirmā spiediena izlīdzināšanās brīža testu parasti turpina 48 stundas, ko apzīmē kā "laiku 0". Lai samazinātu testējamās ķīmiskās vielas zudumus, attiecībā uz gaistošām ķīmiskajām vielām lasījumu un ventilāciju skaits jāierobežo līdz vienai reizei (inkubācijas beigās) vai divām (10).

35. Ja spiediena lasījums ir negatīvs, vārstu neatver. Reizēm caurulē un šļirces adatā sakrājas mitrums, par ko liecina nedaudz negatīvs spiediena lasījums. Tādā gadījumā adatu noņem, cauruli sakrata, nosusina ar salveti un pieliek jaunu adatu.

pH mērīšana

36. Kad izdarīts galīgais spiediena mērījums, mēra un reģistrē katras pudeles satura pH.

▼M6

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu izteikšana

37. Aprēķina katrā laika intervālā katram replikātu komplektam reģistrēto spiedienu summu un vidējo vērtību, kā arī katrā laika intervālā katram replikātu komplektam aprēķina vidējo kumulatīvo gāzes kopējo spiedienu. Attiecībā uz kontroles, testēšanas un standartvielas pudelēm zīmē līknes, vidējo kumulatīvo gāzes ieguvi (Pa) atliekot pret laiku. Uz līknes lineārās daļas izraugās laiku (parasti 48 stundas) un attiecībā uz katru vienādojuma koncentrāciju [1] aprēķina procentuālo inhibēšanos (I):

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

kur:

I = procentuālā inhibēšanās, %;

P_t = gāzes spiediens, kas izraudzītajā laikā radies testējamā materiālā, paskālos (Pa);

P^c = gāzes spiediens, kas tajā pašā laikā radies kontrolparaugā, paskālos (Pa);

Ieteicams uzzīmēt abas diagrammas, t. i., 1. diagrammu ar koncentrāciju salīdzinājumu un arī ar šo koncentrāciju logaritmiem, lai varētu izraudzīties to līkni, kas ir vairāk lineāra. Vizuāli vai regresijas analīzes ceļā pēc vairāk lineārās līknes novērtē EC_{50} (mg/l) vērtību. Salīdzināšanas nolūkos varētu būt noderīgāk ķīmisko vielu koncentrāciju izteikt kā ķīmiskās vielas un kopējās cietvielu daļiņu masas attiecību mg/g. Lai iegūtu šo koncentrāciju, tilpumkoncentrāciju (mg/l) izdala ar sauso dūņu cietvielu daļiņu tilpumkoncentrāciju (g/l) (16. punkts).

38. Ja ir izpētīts pietiekams skaits koncentrāciju, aprēķina procentuālo inhibēšanos attiecībā uz vienu izmantoto ķīmiskās standartvielas koncentrāciju vai EC_{50}.

39. Kontrolparaugā radušos vidējo gāzes spiedienu P_c (Pa) tilpumā pārveido, izmantojot manometra kalibrācijas līkni (2. papildinājums), un pēc tā aprēķina gāzes produkciju, kas izteikta kā tilpums, kurš 48 stundās producējas no 100 ml neatšķaidītu dūņu ar cietvielu daļiņu koncentrāciju 2 % (20 g/l) līdz 4 % (40 g/l).

Derīguma kritēriji

40. ISO starplaboratoriju pētījuma (5) rezultāti parādīja, ka ķīmiskā standartviela (3,5-dihlorfenols) koncentrāciju intervālā no 32 mg/l līdz 510 mg/l (vidēji 153 mg/l) (10. punkts) izraisa gāzes producēšanās inhibēšanos par 50 %. Šis intervāls ir tik plašs, ka stingras inhibēšanās robežas nebija iespējams pārliecinoši noteikt par derīguma kritērijiem; tas būs iespējams tad, kad būs izstrādāti viendabīgāka inokulāta iegūšanas paņēmieni. 48 stundu laikā pudelēs radušās gāzes apjomi bija no 21 ml/g līdz 149 ml/g dūņu sausmasas (vidēji 72 ml/g). Starp radušās gāzes tilpumu un attiecīgo EC_{50} vērtību nebija skaidra sakara. Galīgā pH vērtība bija no 6,1 līdz 7,5.

41. Testu uzskata par derīgu, ja standartvielas kontroles paraugā ar 150 mg/l 3,5-dihlorfenola tiek panākta vairāk nekā 20 % inhibēšanās, tukšajā kontrolparaugā rodas vairāk nekā 50 ml gāzes uz g sausmasas un pH vērtība testēšanas beigās ir no 6,2 līdz 7,5.

Testēšanas pārskats

42. Testēšanas pārskatā jābūt šādai informācijai.

Testējamā ķīmiskā viela

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula un būtiskās fizikālķīmiskās īpašības;

▼M6

— testējamās ķīmiskās vielas tīrība (piemaisījumi).

Testēšanas apstākļi:

— šķidrā satura tilpums un brīvais tilpums testēšanas traukos;

— testēšanas trauku un gāzes mērīšanas apraksti (piemēram, manometra veids);

— testējamās ķīmiskās vielas un ķīmisko standartvielu lietošana testēšanas sistēmā, izmantotās testējamās koncentrācijas un jebkādu šķīdinātāju izmantošana;

— detalizēta informācija par izmantoto inokulātu: notekūdeņu pārstrādes stacijas nosaukums, apstrādāto notekūdeņu avota apraksts (piemēram, darba temperatūra, dūņu aiztures laiks, pārsvarā sadzīves notekūdeņi vai industriālie notekūdeņi u. c.), cietvielu daļiņu koncentrācija, gāzes producēšanās aktivitāte anaerobiskajos bioreaktoros, iepriekšēja ekspozīcija vai iespējama iepriekšēja adaptācija toksiskām ķīmiskām vielām vai dūņu, sedimentu ievākšanas vieta u. c.;

— inkubācijas temperatūra un ilgums;

— replikātu skaits.

Rezultāti

— pH vērtības testēšanas beigās;

— visi mērījumu dati, kas iegūti testēšanas laikā, tukšie un ķīmisko standartvielu kontroltrauki, ja piemērojams, (piemēram, spiediens Pa vai milibāros) tabulas formā;

— procentuālā inhibēšanās testēšanas pudelēs un standartvielu pudelēs un inhibēšanās–koncentrācijas līknes;

— EC_{50} vērtību aprēķins, izsakot to mg/l un mg/g;

— gāzes produkcija uz g dūņu 48 stundās;

— jebkādas testa rezultātu nepieņemamības iemesls;

— secinājumi par rezultātiem, pieminētas jebkādas šīs testēšanas metodes izmantošanā pieļautas novirzes no procedūrām un iztirzātas jebkādas testa rezultātu novirzes no sagaidītā traucējumu vai kļūdu dēļ;

— minēts arī tas, vai testēšanas nolūks bijis izmērīt toksicitāti mikroorganismiem, kas ir vai nav bijuši eksponēti vielai.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma C.11. nodaļa "Aktīvo dūņu elpošanas inhibēšanās tests".

(2) Šā pielikuma C.43. nodaļa "Organisko savienojumu anaerobā noārdīšanās pārstrādes dūņās: gāzes ražošanas mērījumu metode".

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. 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, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and 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 HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

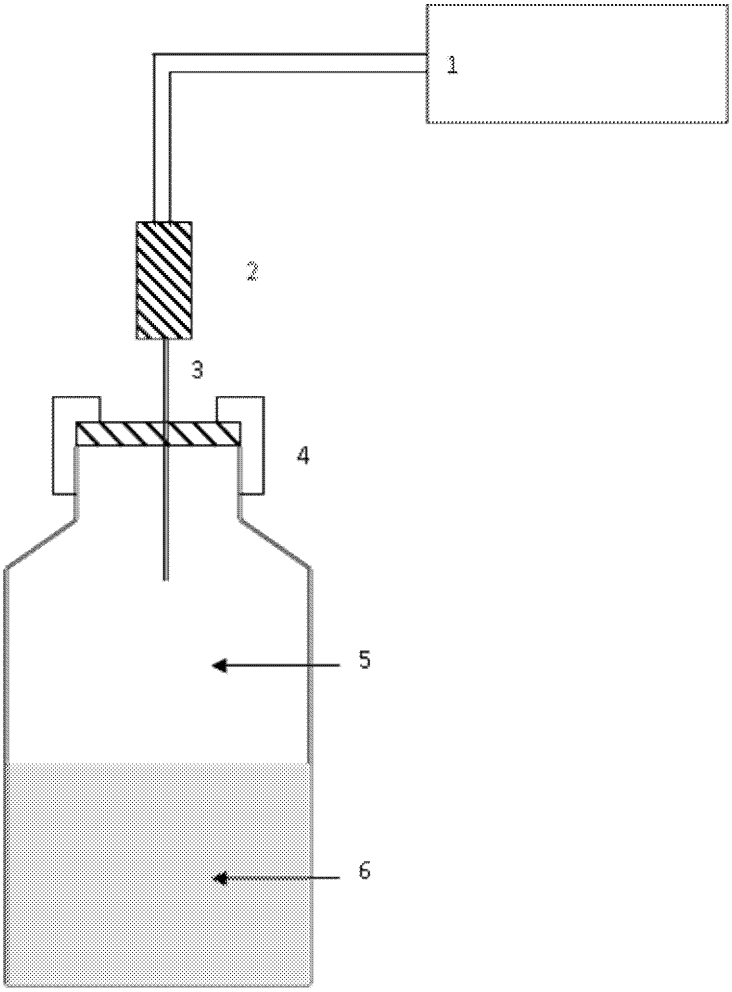
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1. papildinājums

PARAUGS: IEKĀRTAS BIOGĀZES PRODUCĒŠANĀS MĒRĪŠANAI PĒC GĀZES SPIEDIENA



Skaidrojums:

1 – manometrs

2 – trīsvirzienu gāznecaurlaidīgs vārsts

3 – šļirces adata

4 – gāznecaurlaidīga plomba (gofrēta uzmava un blīve)

5 – augšējais slānis

6 – reaģējošu dūņu inokulāts

Testēšanas trauki 35 °C ± 2 °C temperatūrā.

▼M6

2. papildinājums

Manometra rādījumu pārveidošana

Manometra lasījumus var attiecināt uz gāzes tilpumu ar standartlīkņu palīdzību, pēc kurām var aprēķināt radušās gāzes tilpumu uz g sausu dūņu 48 stundās. Šo aktivitātes indeksu izmanto par vienu no kritērijiem testa rezultātu derīguma novērtēšanai. Kalibrācijas līkni iegūst, 35 °C ± 2 °C temperatūrā injicējot zināmus gāzes tilpumus seruma pudelēs, kas satur ūdens tilpumu, kurš vienāds ar reakcijas maisījuma tilpumu V_R.

— Vienādus daudzumus V_R ml ūdens (glabātu 35 °C ± 2 °C) sadala pa piecām seruma pudelēm. Pudeles noslēdz un uz vienu stundu novieto vannā ar 35 °C ± 2 °C siltu ūdeni, lai panāktu izlīdzināšanos.

— Ieslēdz manometru, ļauj tam stabilizēties un noregulē uz nulli.

— Vienā no pudelēm caur plombu izdur šļirces adatu, atver vārstu, līdz manometrs rāda nulli, un vārstu aizver.

— Šo procedūru atkārto atlikušajām pudelēm.

— Katrā pudelē injicē 1 ml gaisa 35 °C ± 2 °C temperatūrā. Vienai no pudelēm (skaitītāja) adatu izdur cauri plombai un ļauj spiediena rādījumam stabilizēties. Reģistrē spiedienu, atver vārstu, līdz spiediena rādītājs rāda nulli, tad vārstu aizver.

— Šo procedūru atkārto atlikušajām pudelēm.

— Atkārto visu procedūru ar 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml un 50 ml gaisa.

— Novelk pārrēķināšanas līkni, kur spiediens (Pa) atlikts pret injicētās gāzes tilpumu (ml). Instrumenta reakcija ir lineāra 0 līdz 70 000 Pa intervālā un pie radušās gāzes tilpuma no 0 līdz 50 ml.

▼M6

3. papildinājums

Konstatētie faktori, kuru dēļ rezultāti var būt aplami

a) *Pudeļu uzmavu kvalitāte*

Komerciāli ir pieejamas dažāda veida seruma pudeļu blīves; daudzas no tām, arī butilgumijas blīves, zaudē necaurlaidību, ja tās šā testa apstākļos caurdur ar adatu. Reizēm no brīža, kad blīve caurdurta ar šļirces adatu, spiediens ļoti lēni samazinās. Lai novērstu noplūdes (12. punkta b) apakšpunkts), ir ieteicams izmantot gāznecaurlaidīgas blīves.

b) *Mitrums šļirču adatā*

Reizēm caurulē un šļirces adatā sakrājas mitrums, par ko liecina nedaudz negatīvs spiediena nolasījums. Lai to labotu, noņem adatu, cauruli sakrata, nosusina ar salveti un pieliek jaunu adatu (12. punkta c) apakšpunkts un 35. punkts).

c) *Kontaminācija ar skābekli*

Anaerobās metodes ir pakļautas kļūdas riskam, kuras iemesls ir ar skābekli notikusi kontaminēšanās, kuras dēļ var samazināties gāzes producēšanās. Šīs metodes lietošanā šāda iespēja jāsamazina līdz minimumam, stingri ievērojot, lai tiktu izmantotas anaerobās metodes, arī bokss ar cimdiem.

d) *Rupjš substrāts dūņās*

Anaerobo gāzes producēšanos un dūņu jutīgumu ietekmē substrāti, kas testēšanas pudelēs iekļūst kopā ar inokulātu. Pārstrādātas dūņas no sadzīves anaerobajiem bioreaktoriem nereti joprojām satur atpazīstamu materiālu, piemēram, matus un augu celulozes paliekas, kas apgrūtina reprezentatīvu paraugu ņemšanu. Rupjo nešķīstošo materiālu var aizvākt, dūņas izsijājot, un tad būs varbūtīgāk, ka ņemtie paraugi būs reprezentatīvi (16. punkts).

e) *Gaistošas testējamās ķīmiskās vielas*

Gaistošas testējamās ķīmiskās vielas nonāks testēšanas pudeļu brīvajā tilpumā. Tādēļ ventilēšanas laikā pēc spiediena mērījumu izdarīšanas no sistēmas var daļēji zust testēšanas materiāls, un EC_{50} vērtības kļūdaini paaugstinās. Kļūdu var samazināt, ja izvēlas piemērotu brīvā tilpuma un šķidruma tilpumu attiecību un pēc spiediena mērīšanas neventilē (10).

f) *Gāzes producēšanās nelinearitāte*

Ja vidējās kumulatīvās gāzes producēšanās vērtības un inkubācijas laika salīdzinājuma diagramma 48 stundu periodā nav aptuveni lineāra, testa pareizība var samazināties. Lai to novērstu, ieteicams izmantot bionoārdošas dūņas no dažādiem avotiem un/vai pievienot testējamā substrāta un barības vielu buljonu, rauga ekstraktu un glikozes koncentrāciju paaugstinātā koncentrācijā (29. punkts).

▼M6

4. papildinājums

Zemas biomasas koncentrācijas vides paraugu lietošana – anaerobās dūņas, sedimenti u. c.

IEVADS

A.1. Dabisku anaerobo dubļu, sedimentu, augšņu u. tml. specifiskā mikrobiālā aktivitāte (saražotās gāzes tilpums uz g sausu cietvielu daļiņu dienā) ir daudz zemāka nekā anaerobām dūņām, kas iegūtas no notekūdeņiem. Tādēļ, kad jāmēra ķīmisko vielu inhibējošā ietekme uz šiem mazāk aktīvajiem paraugiem, daži eksperimentālie apstākļi ir jāmaina. Šo mazāk aktīvo paraugu gadījumā vispār iespējams rīkoties divējādi:

a) lai panāktu precīzāku simulāciju (atbilstoši ISO 13 641 1. daļai), izdarīt modificētu priekštestēšanu (25. punkts) ar neatšķaidītu dūņu, augsnes u. tml. paraugu 35 °C ± 2 °C temperatūrā vai tādā pašā temperatūrā kā parauga ievākšanas vietā;

b) vai arī, lai simulētu zemo aktivitāti, kas sagaidāma vides paraugā, taču uzturot temperatūru 35 °C ± 2 °C (atbilstoši ISO 13 641 2. daļai), veikt testu ar atšķaidītām (1 uz 100) bioreaktora dūņām.

A.2. a) variantu var izpildīt, ievērojot šeit aprakstīto metodi (līdzvērtīga ISO 13 641 1. daļai), bet ir būtiski veikt priekštestēšanu (25. punkts), lai pārliecinātos par optimāliem apstākļiem, ja vien tie nav zināmi jau no iepriekšējās testēšanas. Dūņu vai sedimentu paraugs būtu labi jāsakuļ, piemēram, blenderī, un, ja nepieciešams, jāatšķaida ar nelielu daudzumu atskābekļota ūdens šķīduma (14. punkts), lai tas būtu pietiekami plūstošs pārvietošanai ar pipeti ar platu galu vai mērcilindru. Ja uzskata, ka trūkst barības vielu, dūņu paraugi varētu būt jācentrifugē (anaerobos apstākļos) un suspensija atkārtoti jāpagatavo raugu saturošā minerālu vidē (A. 11).

A.3. b) variants. Saprātīgā mērā tiek imitēta vides paraugu zemā aktivitāte, bet trūkst šiem paraugiem raksturīgās cietvielu daļiņu augstās koncentrācijas. Šo cietvielu daļiņu nozīme inhibēšanā nav zināma, bet ir iespējams, ka testējamo ķīmisko vielu toksicitāti varētu mazināt testējamo ķīmisko vielu un dūņu sastāvdaļu reaģēšana, kā arī testējamo ķīmisko vielu adsorbēšanās uz cietvielu daļiņām.

A.4. Vēl viens svarīgs faktors ir temperatūra – lai nodrošinātu precīzu simulāciju, testēšana jāveic temperatūrā, kāda ir parauga ņemšanas vietā, jo dažādas metānu veidojošo baktēriju grupas, kā zināms, darbojas dažādos temperatūras diapazonos, konkrētāk: termofilās ~ 30–35 °C, mezofilās 20–25 °C un psihrofilās < 20 °C; tādēļ inhibēšanās modeļi var atšķirties.

A.5. Ilgums. Vispārīgā testa 1. daļā ar neatšķaidītām dūņām 2–4 dienu laikā producējušās gāzes daudzums vienmēr bija pietiekams, turpretī 2. daļā ar simtkārtīgi atšķaidītām dūņām starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā gāze producējās nepietiekami vai vispār neproducējās. Madsens *(Madsen)* ar kolēģiem (1996), aprakstot pēdējo minēto testu, apgalvo, ka jāpagaida vismaz septiņas dienas.

Testēšana ar zemu biomasas koncentrāciju (b variants)

Pamattekstā pievieno dažus punktus vai apakšpunktus vai tos aizstāj, to mainot un papildinot šādi:

▼**M6**

A.6. 6. punktā “Testēšanas princips” pievieno šādu tekstu:

“Šo tehniku var izmantot simtkārtīgi atšķaidītām anaerobām dūņām, lai daļēji simulētu dūņu un sedimentu zemo aktivitāti. Inkubācijas temperatūra var būt 35 °C vai tāda pati kā parauga ņemšanas vietā. Tā kā baktēriju aktivitāte ir daudz zemāka nekā neatšķaidītās dūņās, inkubācijas periods jāpagarina līdz vismaz 7 dienām.”

A.7. 12. punkta a) apakšpunktā pievieno šādu tekstu:

“inkubatoram jāspēj darboties temperatūrā, kas nepārsniedz 15 °C.”

A.8. Pēc 13. punkta pievieno papildu reaģentu:

“Fosforskābe (H_3PO_4), masas daļa ūdenī 85 %.”

A.9. 16. punkta beigās pievieno šādu tekstu:

“Testā izmanto galīgo sauso cietvielu daļiņu koncentrāciju 0,20 ± 0,05 g/l.”

A.10. metodes apraksta 17. punkts “Testa substrāts”:

“Šo substrātu nelieto un aizstāj ar rauga ekstraktu (sk. 17. punktu; A.11, A.12, A.13).”

A.11. Anaerobisko dūņu atšķaidīšanai ir nepieciešama minerālvielu barotne, kurā ir arī mikroelementi, un ērti ir barotnei pievienot organisku substrātu, proti, rauga ekstraktu.

Aiz 17. punkta pievieno šādu tekstu:

“a) Testēšanas minerālvielu barotne ar rauga ekstraktu.

To pagatavo no desmitkārtīgas koncentrācijas testēšanas barotnes (17. punkta b) apakšpunkts; A.12. punkts) ar mikroelementu šķīdumu (17. punkta c) apakšpunkts; A.13. punkts). Izmanto jaunpiegādātu nātrija sulfīda nonahidrātu (17. punkta b) apakšpunkts; A.12. punkts) vai arī to pirms lietošanas skalo un žāvē, lai nodrošinātu pietiekamu reducēšanas spēju. Ja testēšana notiek bez boksa ar cimdiem (12. punkta j) apakšpunkts), nātrija sulfīda koncentrācija izejšķīdumā ir jāpaaugstina līdz 2 g/l (no 1 g/l). Lai iegūtu galīgo koncentrāciju 0,2 g/l, nātrija sulfīdu ar attiecīgu izejšķīdumu var pievienot arī caur slēgtu testēšanas pudeļu blīvēm, jo šāda procedūra samazina oksidēšanās risku. Alternatīvi var izmantot titāna (III) citrātu (17. punkta b) apakšpunkts). To caur slēgtu testēšanas pudeļu blīvēm pievieno līdz koncentrācijai 0,8 mmol/l līdz 1,0 mmol/l. Titāna (III) citrāts ir ļoti efektīvs maztoksisks reduktants, ko pagatavo šādi. 50 ml bezskābekļa ūdens izšķīdina 2,94 g trinātrija citrāta dihidrāta (14. punkts) (iegūstot 200 mmol/l šķīduma) un pievieno 5 ml titāna (III) hlorīda šķīduma (15 g/100 ml atšķaidīšanas ūdens). Ar nātrija karbonātu neitralizē līdz pH 7 ± 0,5 un zem slāpekļa gāzes strūklas ielej attiecīgā seruma pudelē. Titāna (III) citrāta koncentrācija šajā izejšķīdumā ir 164 mmol/l. Testēšanas barotni izmanto uzreiz vai 4 °C temperatūrā glabā ne ilgāk kā vienu dienu.

A.12. b) Desmitkārtīga testēšanas barotnes koncentrācija, kas pagatavota ar:

bezūdens kālija dihidrogēnfosfātu (KH_2PO_4)	2,7 g
dinātrija hidrogēnfosfātu (Na_2HPO_4)	4,4 g
(vai 11,2 g dodekahidrātu)	5,3 g
amonija hlorīdu (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalcija hlorīda dihidrātu ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnija hlorīda heksahidrātu ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
dzelzs (II) hlorīda tetrahidrātu ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurīnu (redoksa indikators)	0,01 g
nātrija sulfīda nonahidrātu ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(vai titāna (III) citrātu) galīgajā koncentrācijā	0,8 līdz 1,0 mmol/l
mikroelementu šķīdumu (sk. 17. punkta c) apakšpunktu; A.13. punktu)	10,0 ml
rauga ekstraktu	100 g
Izšķīdina atšķaidīšanas ūdenī (14. punkts), aizpildot līdz	1 000 ml iedaļai.

A.13. c) Mikroelementu šķīdums, kas pagatavots ar:

mangāna (II) hlorīda tetrahidrātu ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborskābi (H_3BO_3)	0,05 g
cinka hlorīdu ($ZnCl_2$)	0,05 g
vara (II) hlorīdu ($CuCl_2$)	0,03 g
nātrija molibdāta dihidrātu ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobalta (II) hlorīda heksahidrātu ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
niķeļa (II) hlorīda heksahidrātu ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinātrija selenītu (Na_2SeO_3)	0,05 g
Izšķīdina atšķaidīšanas ūdenī (14. punkts), aizpildot līdz	1 000 ml iedaļai.”

A.14. 25. punkts. Priekštestēšana

Ir būtiski nepieciešams, lai priekštestēšanu veiktu, kā aprakstīts 24. punktā, izņemot to, ka cietvielu daļiņu koncentrācijai dūņās jābūt simtreiz mazākai, nekā norādīts, t. i., 0,1 g/l, 0,2 g/l un 0,4 g/l. Inkubācijai jāilgst vismaz septiņas dienas.

Piezīme. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (5) brīvais tilpums bija pārāk liels – 75 % no kopējā tilpuma; tam jābūt ieteicamajā 10–40 % līmenī. Svarīgs kritērijs ir tāds, ka ar pieņemamu precizitāti (piemēram, ± 5 % līdz ± 10 %) jāspēj izmērīt gāzes tilpumu, kas rodas pie inhibēšanās 80 %.

A.15. 26.–30. punkts. Testējamās ķīmiskās vielas, inokulāta un substrāta pievienošana.

Pievienošana notiek tādā pašā veidā, kā aprakstīts šajos punktos, bet substrāta šķīdumu (17. punkts) aizstāj ar testēšanas barotni, kam pievienots rauga ekstrakta substrāts (A.11. punkts).

Turklāt sauso dūņu cieto daļiņu galīgo koncentrāciju no 2–4 g/l samazina līdz 0,2 ± 0,05 g/l (A.9. punkts). Divi piemēri sastāvdaļu pievienošanai testēšanas maisījumam ir sniegti A.1. tabulā, kas aizstāj 29. punkta tabulu.

A.16. 33. punkts. Pudeļu inkubācija

Tā kā tiek sagaidīts zemāks gāzes producēšanās ātrums, inkubācijas periods ilgst vismaz septiņas dienas.

▼**M6**

A.17. 34. punkts. Spiediena mērījumi

Ja nepieciešams zināt gāzveida fāzes daudzumus, pudeļu brīvā tilpuma spiediena mērīšanai izmanto to pašu procedūru, kas aprakstīta 34. punktā. Ja jāmēra CO_2 un CH_4 kopējais daudzums, šķidrās fāzes pH samazina līdz apmēram 2, katrā attiecīgajā pudelē injicējot H_3PO_4 un mērot spiedienu pēc 30 minūtēm kratīšanas testēšanas temperatūrā. Tomēr vairāk informācijas par inokulāta kvalitāti var iegūt, ja katrā pudelē spiedienu mēra pirms un pēc paskābināšanas. Piemēram, ja daudz straujāk nekā metāns veidojas CO_2, var būt mainīts fermentatīvo baktēriju jutīgums un/vai testējamā ķīmiskā viela pārsvarā ietekmē metānu veidojošās baktērijas.

A.18. 36. punkts. pH mērīšana

Ja paredzēts izmanto H_3PO_4, īpaši pH mērīšanai sagatavo dažas papildu pudeles, kurām H_3PO_4, nav pievienota.

ATSAUCE:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

A.1. tabula.

Piemēri: testējamo paraugu sagatavošana testēšanai

Reakcijas maisījuma sastāvdaļas	1. piemērs	2. piemērs	Parastā pievienošanas kārtība
Pagatavotā inokulāta koncentrācija (g/l)	0,42	2,1	—
Pievienotā inokulāta tilpums (ml)	45	9	4
Inokulāta koncentrācija testēšanas pudelēs (g/l)	0,20	0,20	—
Pievienotās testēšanas barotnes tilpums (ml)	9	9	2
Pievienotā atšķaidīšanas ūdens tilpums (ml)	36	72	3
Rauga ekstrakta koncentrācija testēšanas pudelēs (g/l)	9,7	9,7	—
Testējamās ķīmiskās vielas izejšķīduma tilpums (ml)	3	3	1
Kopējais šķidruma tilpums (ml)	93	93	—

▼**M6**

5. papildinājums

Definīcijas

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini.

Ķīmiskā viela ir viela vai vielu maisījums.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai vielu maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M6

C.35. *LUMBRICULUS* TOKSICITĀTES TESTS SEDIMENTU-ŪDENS SISTĒMĀ AR PAPILDINĀTIEM SEDIMENTIEM

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 225 (2007. gads). Endobentiskie dzīvnieki, kas barojas ar sedimentiem, potenciāli lielā apjomā var tikt eksponēti sedimentos saistītām ķīmiskām vielām, tāpēc tiem jāpievērš īpaša vērība, piemēram, (1)(2)(3). No sedimentus uzņemošo dzīvnieku vidus ūdens sistēmu sedimentos svarīga nozīme ir ūdens mazsartārpiem. Palielinot sedimentu bioloģisko duļķainību un kalpojot par medījumu, šie dzīvnieki var spēcīgi ietekmēt minēto vielu biopieejamību citiem organismiem, piemēram, bentosa zivīm. Atšķirībā no epibentiskajiem organismiem endobentiskie ūdens mazsartārpi (piemēram, *Lumbriculus variegatus*) ierokas sedimentos un barojas ar sedimentu daļiņām, kas atrodas zem to virsmas. Tas nodrošina, ka testējamie dzīvnieki testējamajai ķīmiskajai vielai ir eksponēti pa visiem iespējamajiem uzņemšanas ceļiem (piemēram, tiešā saskarē ar kontaminētām sedimentu daļiņām un to norīšanā, kā arī ar poru ūdens un virsējā ūdens starpniecību).

2. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai varētu novērtēt endobentisko mazsartārpu *Lumbriculus variegatus (Müller)* ilgstošu eksponēšanu sedimentos saistītām ķīmiskām vielām. Tās pamatā ir līdzšinējo sedimentu toksicitātes un bioakumulācijas testu protokoli, piemēram, (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10). Metodes apraksts attiecas uz statiskiem testēšanas apstākļiem. Šajā testēšanas metodē izmantotais ekspozīcijas scenārijs paredz sedimentu papildināšanu ar testējamo ķīmisko vielu. Ar šo vielu papildināto sedimentu lietošanas mērķis ir modelēt piesārņotus sedimentus.

3. Vielas, kas jātestē, lai noskaidrotu to iedarbību uz sedimentos dzīvojošiem organismiem, parasti šajā vides segmentā saglabājas ilgi. Sedimentos dzīvojošie organismi var tikt eksponēti pa dažādiem ceļiem. Katra ekspozīcijas ceļa relatīvā nozīme un laiks, kam jāpaiet, lai kopējā toksiskajā ietekmē izpaustos to līdzietekme, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām un tās galīgā likteņa dzīvnieka organismā. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar log K_{ow} > 5) vai kas ar sedimentiem veido kovalentu saiti, būtisks ekspozīcijas ceļš var būt barošanās ar piesārņotu barību. Lai šādu ķīmisko vielu toksicitāti nenovērtētu par zemu, pirms testējamās ķīmiskās vielas lietošanas sedimentiem pievieno barību, kas nepieciešama, lai nodrošinātu testējamo organismu vairošanos un augšanu (11). Aprakstītā testēšanas metode ir pietiekami detalizēta, lai testēšanu varētu veikt, eksperimenta plānu koriģējot atkarībā no apstākļiem konkrētajās laboratorijās un testējamo ķīmisko vielu atšķirīgajiem raksturlielumiem.

4. Testēšanas metode ir paredzēta, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz testējamo dzīvnieku vairošanos un biomasu. Mērāmie bioloģiskie parametri ir kopējais izdzīvojušo tārpu skaits un biomasa (saussvars) ekspozīcijas beigās. Šos datus analizē, vai nu ar regresijas modeli nosakot koncentrāciju, kas radītu ietekmi x % (piem., EC_{50}, EC_{25} un EC_{10}), vai statistiskās hipotēzes testēšanā nosakot nenovērotās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)* un zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju *(LOEC)*.

5. Šā pielikuma C.27. nodaļā "Trīsuļodu toksicitātes tests sedimentu-ūdens sistēmā ar papildinātiem sedimentiem" (6) sniegts daudz būtiskas un noderīgas detalizētas informācijas par attiecīgās sedimentu toksicitātes testēšanas metodes izpildi. Tādēļ, pamatojoties uz šo dokumentu, tika izstrādātas modifikācijas sedimentu toksicitātes testu veikšanai ar *Lumbriculus variegatus.* Papildu atsauču dokumenti ir, piemēram, *ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by*

▼M6

Benthic Invertebrates (3), *U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* (7) un *ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates* (12). Turklāt šā dokumenta sagatavošanā būtiski nozīmīgi avoti bija šīs testēšanas metodes starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (13, starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas ziņojums) gūtā praktiskā pieredze un literatūras dati.

PRIEKŠNOTEIKUMI UN NORĀDĪJUMI

6. Pirms pētījuma uzsākšanas jāiegūst informācija par testējamo ķīmisko vielu, piemēram, par drošības pasākumiem, pareizas glabāšanas apstākļiem un analīzes metodēm. Norādījumi par to, kā testēt vielas, kuru fizikālķīmiskās īpašības to testēšanu apgrūtina, sniegti (14).

7. Pirms testa veikšanas par testējamo ķīmisko vielu jābūt noskaidrotai šādai informācijai:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums (vēlams, *IUPAC* nomenklatūrā), struktūrformula, *CAS* reģistra numurs, tīrība;

— tvaika spiediens;

— šķīdība ūdenī.

8. Pirms testa uzsākšanas par noderīgu uzskatāma šāda informācija:

— oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow});

— organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficients, izteikts kā K_{oc};

— hidrolīze;

— fototransformācija ūdenī;

— bionoārdāmība;

— virsmas spraigums.

9. Informācija par izmantošanai paredzēto sedimentu atsevišķiem rādītājiem jāiegūst pirms testa sākšanas (7). Detalizētu informāciju sk. 22. un 25. punktā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

10. Tārpus vienādā fizioloģiskā stāvoklī (sinhronizētus saskaņā ar 5. papildinājumu) eksponē sedimentu-ūdens sistēmas sedimentu fāzē ievadīta toksikanta koncentrāciju rindai. Par barotni jāizmanto mākslīgie sedimenti un rekonstituēts ūdens. Par kontrolparaugiem izmanto testēšanas traukus bez testējamās ķīmiskās vielas. Lai mazinātu mainību attiecībā uz replikātiem katrā koncentrācijas grupā, sedimentu papildināšanu ar testējamo ķīmisko vielu katram koncentrācijas līmenim izdara no liela tilpuma, un pēc tam testēšanas traukos, kuros sedimentu un ūdens koncentrācija līdzsvarota, ievieto testa organismus (sk. 29. punktu). Testēšanas organismus sedimentu-ūdens sistēmām eksponē 28 dienas. Ņemot vērā zemo barības vielu saturu mākslīgajā augsnē, sedimenti jābagātina ar barības avotu (sk. 22. un 23. punktu un 4. papildinājumu), lai nodrošinātu, ka tārpi kontrolapstākļos aug un vairojas. Tādā veidā nodrošina, ka testa dzīvniekus vielai eksponē gan ar ūdeni un sedimentiem, gan ar barību.

11. Šā tipa pētījuma vēlamais beigupunkts ir vairošanās un biomasas EC_x (piemēram, EC_{50}, EC_{25}, un EC_{10}; ietekmes koncentrācija, kas ietekmē x % testa organismu), respektīvi, salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Tomēr jāpiebilst, ka, ņemot vērā, ka zemām EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{25}) ir raksturīga liela nenoteiktību ar ārkārtīgi augstu ticamības robežu 95 % (piemēram, (15)) un statistisko jaudu, kas aprēķināta hipotēzes pārbaudes laikā, par

▼M6

visnoturīgāko beigupunktu uzskata EC_{50}. Turklāt, ja ar testēšanas plānu un datiem šādi aprēķini iespējami (sk. 34. un 38. punktu), biomasas un vairošanās rādītājiem var aprēķināt nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)* un zemākās novērojamās ietekmes koncentrāciju *(LOEC)*. Testēšanas plāns ir atkarīgs no tā, vai pētījuma nolūks ir EC_x vai *NOEC* iegūšana.

STANDARTTESTI

12. Sagaidāms, ka kontrolgrupas organismu izturēšanās pietiekami pierādīs laboratorijas spēju veikt testu un, ja ir pieejami vēsturiski dati, testa atkārtojamību. Turklāt, lai novērtētu testa organismu jutīgumu, ar regulāriem starplaikiem var veikt toksicitātes standarttestus ar standarta toksikantu. Testa dzīvnieku jutīgumu un stāvokli var apmierinoši pierādīt 96 h toksicitātes standarttesti (tikai ūdenī) (4)(7). Informācija par pentahlorfenola (PHF) toksicitāti pabeigtos testos (28 d. eksponēšana papildinātiem sedimentiem) ir iekļauta 6. papildinājumā un pārskatā par testēšanas metodes starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu (13). PHF specifiskā akūtā toksicitāte (tikai ūdenī) ir aprakstīta, piemēram, (16). Šo informāciju var izmantot, lai testa organismu jutību standarttestos salīdzinātu ar PHF kā standarta toksikantu. Ieteicami *L. variegatus* standarta toksikanti ir kālija hlorīds (KCl) vai vara sulfāts ($CuSO_4$) (4)(7). Līdz šim brīdim nav noskaidroti kvalitātes kritēriji, kuru pamatā būtu dati par KCl toksiskumu, jo par *L. variegatus* trūkst literatūras datu. Informāciju par vara toksiskumu *L. variegatus* var atrast (17) līdz (21) avotā.

TESTA DERĪGUMS

13. Lai tests būtu derīgs, ir jāizpilda šādas prasības.

— Starplaboratoriju salīdzinošā testēšana (13) pierādījusi, ka attiecībā uz *Lumbriculus variegatus* ekspozīcijas beigās vidējam dzīvo tārpu skaitam uz kontroles replikātu salīdzinājumā ar tārpu skaitu uz replikātu ekspozīcijas sākumā ir jāpalielinās vismaz 1,8 reizes.

— Visā testēšanas laikā virsējā ūdens pH jābūt no 6 līdz 9.

— Testēšanas laikā virsējā ūdens skābekļa koncentrācija nedrīkstētu būt zemāka par 30 % gaisa piesātinājuma vērtības (*ASV*) testēšanas temperatūrā.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Testēšanas sistēma

14. Ir ieteicamas statiskas sistēmas, kurās virsējo ūdeni neaizstāj. Pie attiecīgas sedimentu un ūdens attiecības (sk. 15. punktu) parasti ar vieglu aerēšanu pietiek, lai uzturētu testa organismiem pieņemamu ūdens kvalitāti (piemēram, palielināt izšķīdušā skābekļa saturu, samazināt vielmaiņas galaproduktu uzkrāšanos). Pusstatiskas sistēmas vai caurplūdes sistēmas, kurās virsējo ūdeni regulāri vai pastāvīgi atjaunina, izmanto tikai izņēmuma gadījumos, jo sagaidāms, ka regulāra virsējā ūdens atjaunināšana ietekmēs ķīmisko līdzsvaru (piemēram, testēšanas sistēmā rodas testējamās ķīmiskās vielas zudumi).

Testēšanas trauki un aparatūra

15. Eksponēšana jāveic stikla mērglāzēs ar, piemēram, 250 ml tilpumu un 6 cm diametru. Var izmantot arī citus piemērotus stikla traukus, bet tiem jānodrošina attiecīgs virsējā ūdens un sedimentu dziļums. Katrā traukā jābūt

▼M6

apmēram 1,5–3 cm dziļam pagatavoto sedimentu slānim. Sedimentu slāņa dziļuma attiecībai pret virsējā ūdens dziļumu jābūt 1:4. Trauku tilpumam jāatbilst noslogojumam, proti, testa tārpu skaitam uz sedimentu svara vienību (sk. arī 39. punktu).

16. Testēšanas traukiem un citai aparatūrai, kas nonāk saskarē ar testējamo ķīmisko vielu, jābūt viscaur no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. Jācenšas nevienā aprīkojuma daļā neizmantot materiālus, kas var izšķīst, absorbēt testējamās vielas vai izskalot citas vielas un nelabvēlīgi ietekmēt testa dzīvniekus. Jebkuram aprīkojumam, kas ir saskarē ar testēšanas vidēm, jābūt no politetrafluoretilēna (PTFE), nerūsošā tērauda un/vai stikla. Tādu organisko ķīmisko vielu gadījumā, par kurām zināms, ka tās adsorbējas pie stikla, var būt nepieciešams silanizēts stikls. Šādās situācijās aprīkojums pēc izmantošanas būs jālikvidē.

Testa sugas

17. Šā tipa pētījumā izmantotās testa sugas ir saldūdens mazsartārps *Lumbriculus variegatus (Müller)*. Šai sugai pieņemami ir daudz un dažādi sedimentu tipi, un to plaši izmanto sedimentu toksicitātes un bioakumulācijas testēšanā [piemēram, (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Pārskatā jāatspoguļo testa dzīvnieku izcelsme, sugas identitātes apstiprinājums (piemēram, (36)), kā arī kultivēšanas apstākļi. Ja organismi iegūti no laboratorijas kultūras, pirms katras testēšanas identificēt sugu nav vajadzīgs.

Testa organismu kultivēšana

18. Lai tārpu skaits sedimentu toksicitātes testu veikšanai būtu pietiekams, tos ir lietderīgi turēt pastāvīgā laboratorijas kultūrā. Norādījumi par *Lumbriculus variegatus* kultivēšanas metodēm laboratorijas apstākļos un sākumkultūru avotiem ir sniegti 5. papildinājumā. Sīkāku informāciju par šo sugu kultivēšanu sk. avotos (3), (7), (27).

19. Lai nodrošinātu, ka testēšanu veic ar vienas un tās pašas sugas dzīvniekiem, ir stingri ieteicams izveidot viensugas kultūru. Pārliecinieties, ka testēšanā izmantotās kultūras un jo īpaši tārpi ir bez pamanāmām slimībām un anomālijām.

Ūdens

20. Testēšanā par virsējo ūdeni ieteicams izmantot rekonstituētu ūdeni saskaņā ar šā pielikuma C.1. nodaļu (37); to var izmantot arī tārpu laboratorijas kultūrās (pagatavošanu sk. 2. papildinājumā). Ja nepieciešams, var izmantot dabisko ūdeni. Izraudzītā ūdens kvalitātei jābūt tādai, lai aklimatizācijas laikā un testēšanas periodos testa sugas augtu un vairotos bez izskata vai izturēšanās anomāliju parādīšanās. Ir pierādīts, ka *Lumbriculus variegatus* šāda veida ūdenī spēj izdzīvot, augt un vairoties (30), un ir nodrošināta maksimāla testa un kultivēšanas nosacījumu standartizācija. Ja izmanto rekonstituētu ūdeni, pārskatā jāatspoguļo tā sastāvs un pirms izmantošanas ūdens jāraksturo vismaz pēc pH, skābekļa satura un cietības (izsaka kā mg $CaCO_3$/l). Lietderīgu informāciju pirms izmantošanas var sniegt ūdens analīze attiecībā uz mikropiesārņotājiem (sk., piemēram, 3. papildinājumu).

21. Virsējā ūdens pH jābūt robežās no 6,0 līdz 9,0 (sk. 13. punktu). Ja sagaidāma pastiprināta amonjaka producēšanās, uzskata, ka pH ir lietderīgi uzturēt no 6,0 līdz 8,0. Piemēram, vāju organisko skābju testēšanas gadījumā ieteicams pH koriģēt, testēšanas ūdenim pievienojot buferšķīdumus, kā tas aprakstīts, piemēram, 16. avotā. Testēšanas ūdens kopējai cietībai jābūt no 90 līdz 300 mg $CaCO_3$ uz litru dabiskā ūdens. Saskaņā ar ESAO *TG* 210. (38) pieņemama atšķaidīšanas ūdens papildkritēriji ir apkopoti 3. papildinājumā.

▼M6

Sedimenti

22. Tā kā iespējams, ka nepiesārņoti dabiskie sedimenti no konkrēta avota nav visu gadu pieejami un testēšanu var ietekmēt vietējie organismi, kā arī mikropiesārņotāju klātbūtne, vēlams izmantot pagatavotus sedimentus (dēvē arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem sedimentiem). Pagatavotu sedimentu izmantošana testēšanas apstākļu mainību, kā arī klātesošās faunas ieviešanos samazina līdz minimumam. Turpmāk aprakstīto pagatavoto sedimentu pamatā ir literatūras avotiem (6), (39) un (40) atbilstoši mākslīgie sedimenti. Tos ieteicams izmantot šā tipa testos ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

a) 4–5 % (saussvars) sfagnu kūdras; ir svarīgi izmantot kūdru pulvera veidā ar "vidēju" sadalīšanās pakāpi, smalki samaltu (daļiņu izmērs ≤ 0,5 mm) un tikai gaisā žāvētu;

b) 20 ± 1 % (saussvars) kaolīna mālu (vēlamais kaolinīta saturs virs 30 %);

c) 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (smalkas, graudiņu izmērs ≤ 2 mm, bet > 50 % daļiņu izmēram jābūt 50–200 μm);

d) dejonizēts ūdens, 30–50 % sedimentu saussvara papildus sausajām sedimentu sastāvdaļām;

e) lai koriģētu galīgā sedimentu maisījuma pH, pievieno ķīmiski tīru kalcija karbonātu ($CaCO_3$);

f) galīgā maisījuma kopējā organiskā oglekļa (*TOC*) saturam jābūt 2 % (± 0,5) sedimentu saussvara, un tas jākoriģē, izmantojot attiecīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu;

g) barība, piemēram, samaltas, izžāvētas nātru lapas (*Urtica* sugas, saskaņā ar farmācijas standartiem, cilvēku lietošanai) vai samaltu, izžāvētu *Urtica* sugu lapu un alfa-celulozes maisījums (1:1) – 0,4–0,5 % sedimentu saussvara papildus sausajām sedimentu sastāvdaļām; sīkāku informāciju sk. 4. papildinājumā.

23. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu, barības materiāla un smilšu avotam. Papildus g) sastāvdaļai šā pielikuma (6) nodaļā C.27. norādīti alternatīvi augu materiāli, ko var izmantot par barības avotu: dehidrētas zīdkoka lapas *(Morus alba)*, baltais āboliņš *(Trifolium repens)*, spināti *(Spinacia oleracea)* vai labības zāle.

24. Izraudzītais barības avots jāpievieno, pirms sedimentus papildina ar testējamo ķīmisko vielu, vai papildināšanas laikā. Izraudzītajam barības avotam jānodrošina vismaz pieņemama vairošanās kontrolgrupā. Var būt lietderīgi mākslīgos sedimentus vai to sastāvdaļas pirms izmantošanas analizēt attiecībā uz mikropiesārņotājiem. Mākslīgo sedimentu pagatavošanas piemērs ir aprakstīts 4. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja pierāda, ka sedimentu sastāvdaļas pēc virsējā ūdens pievienošanas neatdalās (piemēram, pa ūdens virsmu nepeld kūdras daļiņas) un ka kūdra vai sedimenti ir pietiekami labi pagatavoti (sk. 4. papildinājuma 25. punktu). Mākslīgie sedimenti jāraksturo vismaz pēc sastāvdaļu izcelsmes, graudiņu izmēra sadalījuma (procentos smiltis, dūņas un māls), kopējā organiskā oglekļa (*TOC*) satura, ūdens satura un pH. Redokspotenciāla mērīšana nav obligāta.

25. Ja, piemēram, specifiskiem testēšanas nolūkiem tas nepieciešams, par testēšanas un/vai kultūras sedimentiem var izmantot arī dabiskos sedimentus no nepiesārņotām vietām (3). Tomēr, ja izmanto dabiskos sedimentus, tie jāraksturo vismaz pēc izcelsmes (ievākšanas vietas), pH un amonjaka satura poru ūdenī, pēc kopējā organiskā oglekļa (*TOC*) satura un slāpekļa satura, daļiņu sadalījuma pēc lieluma (procentos smiltis, dūņas un māls) un ūdens satura

▼M6

procentos (7), un tiem jābūt bez jebkāda piesārņojuma un citiem organismiem, kas varētu konkurēt ar testa organismiem vai ar tiem baroties. Pēc izvēles var mērīt redokspotenciālu un katjonu apmaiņas kapacitāti. Pirms papildināšanas ar testējamo ķīmisko vielu ir ieteicams dabiskos sedimentus septiņas dienas nogatavināt tādos pašos apstākļos, kādi būs turpmākajā testā. Šā nogatavināšanas perioda beigās virsējais ūdens jānolej un jāizlej.

26. Izmantošanai paredzēto sedimentu kvalitātei jābūt tādai, lai kontrolgrupu organismi ekspozīcijas periodā spētu izdzīvot un vairoties bez izskata un izturēšanās anomāliju parādīšanās. Kontrolgrupas tārpiem jāierokas sedimentos un jāsāk ar tiem baroties. Vairošanās rādītājiem kontrolgrupu paraugos jāatbilst vismaz 13. punktā aprakstītajiem derīguma kritērijiem. Jāatzīmē, vai sedimentu virskārtā ir vai nav fekāliju granulas, kas liecina, ka tārpi sedimentus ir sagremojuši, un tas var palīdzēt interpretēt testēšanas rezultātus attiecībā uz ekspozīcijas ceļiem. Papildu informācija par barošanos ar sedimentiem ir iegūstama, izmantojot literatūras avotos (24), (25), (44) un (45) aprakstītās metodes, pēc kurām var precizēt barošanos ar sedimentiem vai daļiņu atlasi testa organismos.

27. Manipulācijas, kas ar dabiskajiem sedimentiem veicamas, pirms tos izmanto laboratorijā, ir aprakstītas avotos (3), (7) un (12). *Lumbriculus* testam ieteicamo mākslīgo sedimentu pagatavošana un glabāšana ir aprakstīta 4. papildinājumā.

Testējamās ķīmiskās vielas lietošana

28. Sedimentus papildina ar testējamo ķīmisko vielu. Tā kā sagaidāms, ka lielākajai daļai testējamo ķīmisko vielu būs zema šķīdība ūdenī, tad, lai sagatavotu izejšķīdumu, tās iespējami mazā tilpumā jāizšķīdina piemērotā organiskā šķīdinātājā (piemēram, acetonā, n-heksānā, cikloheksānā). Testēšanas šķīdumus pagatavo, ar to pašu šķīdinātāju atšķaidot izejšķīdumu. Piemērota šķīdinātāja izvēles galvenajam kritērijam jābūt šķīdinātāja toksicitātei un gaistamībai, kā arī testējamās vielas šķīdībai izraudzītajā šķīdinātājā. Visiem koncentrācijas līmeņiem jāizmanto vienāds attiecīgā šķīduma tilpums. Viena koncentrācijas līmeņa sedimenti ar testējamo ķīmisko vielu jāpapildina vienlaikus, lai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas atšķirības vienas grupas replikātu vidū būtu minimālas. Katru testa šķīdumu tad sajauc ar kvarca smiltīm, kā aprakstīts 22. punktā (piemēram, 10 g kvarca smilšu uz testēšanas trauku). Ir konstatēts, ka kvarca smiltis pilnīgi samirkst 0,20–0,25 ml tilpumā uz g smilšu. Pēc tam šķīdinātājs jāiztvaicē, līdz smiltis ir sausas. Lai līdz minimumam samazinātu testējamās ķīmiskās vielas zudumus līdzizgarošanā (piemēram, atkarībā no ķīmiskās vielas tvaika spiediena), pārklātās smiltis jāizmanto uzreiz pēc izžāvēšanas. Sausās smiltis sajauc ar piemērotu daudzumu pagatavotu attiecīga koncentrācijas līmeņa sedimentu. Sedimentu gatavošanā jāņem vērā smilšu daudzums testējamās ķīmiskās vielas un smilšu maisījumā (t. i., sedimenti tādēļ jāgatavo, izmantojot mazāk smilšu). Šīs procedūras galvenā priekšrocība ir tāda, ka sedimentos šķīdinātājs faktiski nenonāk (7). Alternatīva ir, piemēram, dabisko sedimentu gadījumā testējamo ķīmisko vielu pievienot, tā, kā iepriekš aprakstīts par kvarca smiltīm, papildinot smalki samaltu sedimentu porciju vai arī testējamo ķīmisko vielu iemaisot mitros sedimentos, un pēc tam jebkādam izmantotajam šķīdinātājam ļaujot izgarot. Jācenšas nodrošināt, lai sedimentiem

▼M6

pievienotā testējamā ķīmiskā viela tajos būtu viscaur un vienmērīgi izkliedēta. Ja nepieciešams, var analizēt apakšparaugus, lai apstiprinātu mērķkoncentrācijas sedimentos un noteiktu homogenitātes pakāpi. Lai apstiprinātu mērķkoncentrācijas sedimentos, var būt lietderīgi arī analizēt testa šķīdumu apakšparaugus. Tā kā kvarca smilšu pārklāšanai ar testējamo ķīmisko vielu izmanto šķīdinātāju, jāizmanto arī šķīdinātāja kontrole, ko pagatavo ar tādu pašu šķīdinātāja daudzumu kā testa sedimentus. Pārskatā jāatspoguļo arī papildināšanai izmantotā metode un iemesls, kura dēļ izraudzīta specifiska papildināšanas procedūra, kas nav iepriekš aprakstītā procedūra. Papildināšanas metodi var pielāgot testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, piemēram, lai viela izgarojot nezustu papildināšanas vai līdzsvarošanās laikā. Papildu norādījumi par papildināšanas procedūrām ir sniegti *Environment Canada* (1995) materiālā (46).

29. Kad papildinātie sedimenti ir pagatavoti, sadalīti pa testēšanas trauku replikātiem un pārlieti ar testēšanas ūdeni, ir vēlams pagaidīt, kamēr testējamā ķīmiskā viela sadalīsies sedimentu un ūdens fāzē (piemēram, (3)(7)(9)). To vēlams īstenot tādos pašos temperatūras un aerācijas apstākļos, kādus izmanto testēšanā. Attiecīgais līdzsvarošanās laiks ir atkarīgs no sedimentiem un ķīmiskās vielas un var ilgt no dažām stundām līdz vairākām dienām, retos gadījumos – vairākas nedēļas (4–5) (piemēram, (27)(47)). Šajā testā negaida līdzsvara iestāšanos, bet 48 stundu līdz 7 dienu līdzsvarošanās periods ir ieteicams. Tādējādi testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās tiks samazināta līdz minimumam. Atkarībā no pētījuma mērķa, piemēram, vides apstākļu imitācijas, papildinātos sedimentus līdzsvarot vai nogatavināt var ilgāku periodu.

30. Šā līdzsvarošanas perioda beigās testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas analīzei jāņem vismaz virsējā ūdens un sedimentu pamatmasas paraugi vismaz augstākajā un zemākajā koncentrācijā. Šajās testējamās ķīmiskās vielas analītiskajās noteikšanās jāvar aprēķināt masas bilanci un rezultātus izteikt uz izmērīto sākumkoncentrāciju pamata. Vispār paraugu ņemšana sedimentu–ūdens sistēmu traucē vai sagrauj. Tāpēc vienus un tos pašus replikātus izmantot gan sedimentu, gan tārpu paraugu ņemšanai parasti nav iespējams. Ir jāsagatavo attiecīga izmēra papildu "analītiskie" trauki, ko apstrādā tādā pašā veidā (tajos ir arī testa organismi), bet neizmanto bioloģiskajiem novērojumiem. Trauku izmēri jāizraugās tā, lai varētu nodrošināt analītiskajai metodei nepieciešamos paraugu apjomus. Sīkāka informācija par paraugu ņemšanu ir aprakstīta 53. punktā.

TESTĒŠANAS NORISE

Priekštestēšana

31. Ja par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi uz *Lumbriculus variegatus* nav pieejama nekāda informācija, varētu būt noderīgi veikt priekšeksperimentu, lai noteiktu galīgajā testā testējamo koncentrāciju diapazonu un optimizētu galīgā testa nosacījumus. Šim nolūkam izmanto testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju rindu ar lieliem intervāliem. Tārpus katrai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai eksponē periodā (piemēram, 28 d. kā galīgajā testā), kas ļauj aplēst attiecīgās testējamās koncentrācijas; kontrolgrupas nav vajadzīgas. Priekštestēšanā jānovēro un jāatzīmē tārpu izturēšanās, piemēram, vairīšanās no sedimentiem, kuru var būt izraisījusi testējamā ķīmiskā viela un/vai paši sedimenti. Priekštestēšanā nav ieteicams testēt koncentrācijas, kas augstākas par 1 000 mg uz kg sedimentu saussvara.

Galīgais tests

32. Pamatojoties uz diapazonu noteikšanai veiktās priekštestēšanas rezultātiem (31. punkts), galīgajā testā jāizmanto un jāizraugās vismaz piecas koncentrācijas, un jāievēro 35., 36., 37. un 38. punkts.

▼M6

33. Papildus testu sērijai izveido kontrolgrupu (par replikāciju sk. 36., 37. un 38. punktu) ar paraugiem, kas satur tās pašas sastāvdaļas, izņemot testējamo ķīmisko vielu. Ja kādu šķīdināšanas līdzekli izmanto testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai, tas nedrīkst būtiski ietekmēt testa organismus, ko pārbauda papildu kontrolgrupā tikai ar šķīdinātāju.

Testēšanas plāns

34. Testēšanas plāns attiecas uz testa koncentrāciju skaita un intervāla izraudzīšanos, trauku skaitu katrai koncentrācijai un pievienoto tārpu skaitu uz trauku. EC_x un *NOEC* noteikšanas, kā arī robežtesta plāni ir aprakstīti 35., 36., 37. un 38. punktā.

35. Testa koncentrācijām jāaptver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) un to koncentrāciju diapazons, kurās vēlas noskaidrot ķīmiskās vielas ietekmi. Jāizvairās ekstrapolēt stipri zem zemākās koncentrācijas, kurā vērojama ietekme uz testa organismiem, vai virs augstākās testētās koncentrācijas. Ja izņēmuma gadījumā šādu ekstrapolāciju veic, pārskatā tas pilnīgi jāizskaidro.

36. Ja jāaprēķina EC_x, jātestē vismaz piecas koncentrācijas un attiecībā uz katru koncentrāciju vismaz trīs replikāti; lai labāk aplēstu variabilitāti kontrolgrupā, tajā iesaka izmantot sešus vienādas koncentrācijas paraugus vai, ja izmanto šķīdinātāju, šķīdinātāja kontrolparaugu. Jebkurā gadījumā ieteicams izmantot pietiekamu daudzumu testa koncentrāciju, lai nodrošinātu labu aplēses paraugu. Blakusesošu koncentrāciju dalījums nedrīkst būt lielāks par divi (izņēmumu var pieļaut gadījumos, kur koncentrācijas atbildreakcijas līknei ir lēzens slīpums). Replikātu skaitu katrā apstrādē var samazināt, ja palielina testa koncentrāciju skaitu ar atbildreakcijām intervālā 5–95 %. Replikātu skaita palielināšana vai testa koncentrāciju intervālu samazināšana dod šaurākus testa ticamības intervālus.

37. Ja jāaplēš *LOEC/NOEC* vērtības, jāizmanto vismaz piecas testa koncentrācijas ar vismaz četriem paraugiem katrai (lai labāk aplēstu variabilitāti kontrolgrupā, tajā iesaka izmantot sešus vienādas koncentrācijas paraugus vai, ja izmanto šķīdinātāju, šķīdinātāja kontrolparaugu) un blakusesošu koncentrāciju dalījumam nav ieteicams pārsniegt divi. Informācija par statistisko jaudu, kas noskaidrota hipotēzes pārbaudē testa metodes starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, ir sniegta 6. papildinājumā.

38. Ja ar koncentrāciju līdz 1 000 mg uz kg sedimentu saussvara nekāda ietekme netiek sagaidīta (piemēram, tas konstatēts priekštestēšanā veiktajā diapazona noteikšanā) vai ja interesējošo *NOEC* vērtību apstiprināšanai pietiks ar vienas koncentrācijas testēšanu, var veikt robežtestu (ar vienu testa koncentrāciju un kontrolparaugiem). Pēdējā gadījumā testēšanas pārskatā detalizēti jāpamato robežkoncentrāciju izvēle. Robežtesta mērķis ir testu izpildīt ar tik augstu koncentrāciju, lai lēmēji varētu izslēgt ķīmiskās vielas iespējamu toksisku ietekmi, un robežvērtību nosaka tādā koncentrācijā, kādas rašanos neprognozē nekādā gadījumā. Ieteicams 1 000 mg/kg (saussvara). Parasti ir vajadzīgi vismaz seši replikāti gan apstrādei, gan kontrolgrupai. Informācija par testa metodes starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā hipotēzes pārbaudē noskaidroto statistisko jaudu ir sniegta 6. papildinājumā.

Ekspozīcijas apstākļi

Testa organismi

39. Testēšanu veic ar vismaz 10 tārpiem katrā replikātā, ko izmanto bioloģisko parametru noteikšanā. Šāds tārpu skaits atbilst apmēram 50–100 mg mitrās biomasas. Pieņemot, ka sausais saturs ir 17,1 % (48), iegūtais rezultāts ir apmēram 9–17 mg sausās biomasas uz trauku. ASV Vides aizsardzības aģentūra (2000, (7)) iesaka noslogojumu, kas nepārsniedz sausās biomasas

▼M6

un *TOC* attiecību 1:50. Attiecībā uz 22. punktā aprakstītajiem pagatavotajiem sedimentiem tas atbilst apmēram 43 g sedimentu (saussvars) uz 10 tārpiem pie *TOC* 2,0 % sauso sedimentu. Gadījumos, kur uz vienu trauku izmanto vairāk nekā 10 tārpus, attiecīgi jāpielāgo sedimentu un virsējā ūdens daudzums.

40. Tārpiem, ko izmanto testēšanā, jānāk no viena un tā paša avota un jābūt līdzīgā fizioloģiskajā stāvoklī (sk. 5. papildinājumu). Jāizraugās līdzīga lieluma tārpi (sk. 39. punktu). Pirms testēšanas ieteicams nosvērt tārpu partijas vai kultūras apakšparaugu, lai noteiktu vidējo svaru.

41. Testēšanas tārpus izņem no kultūras (detalizētu informāciju sk. 5. papildinājumā). Lielus (pieaugušus) dzīvniekus bez nesenas fragmentācijas pazīmēm pārvieto uz stikla šķīvīšiem (piemēram, Petri platēm), kas satur tīru ūdeni. Pēc tam tos sinhronizē, kā aprakstīts 5. papildinājumā. Testēšanā izmanto veselus līdzīga izmēra tārpus pēc 10 līdz 14 d. reģenerācijas, kuri pēc vieglas mehāniskas stimulēšanas aktīvi peld vai rāpo. Ja testēšanas apstākļi (piemēram, pēc temperatūras, gaismas režīma un virsējā ūdens) atšķiras no kultivēšanas apstākļiem, lai tārpi pielāgotos testēšanas apstākļiem, pietiek ar, piem., 24 h aklimatizāciju testa temperatūrā, gaismas režīmā un tādā pašā virsējā ūdenī. Pielāgojušies mazsartārpi jāsadala pa testēšanas traukiem pēc nejaušības principa.

Barošana

42. Tā kā barību sedimentiem pievieno pirms testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas (vai tās laikā), tārpus testēšanas laikā papildus nebaro.

Gaisma un temperatūra

43. Kultūras un testa fotoperiods parasti ir 16 stundas (3)(7). Gaismas intensitāte jāuztur zemā līmenī (piemēram, 100–500 lx), lai imitētu dabiskos apstākļus sedimentu virskārtā, un ekspozīcijas periodā vismaz vienreiz jāmēra. Temperatūrai visā testēšanas laikā jābūt 20 ± 2 °C. Vienā konkrētā mērīšanas datumā atšķirībai starp testēšanas traukiem nav ieteicams pārsniegt ± 1 °C. Testēšanas trauki testēšanas inkubatorā vai testēšanas zonā jānovieto pēc nejaušības principa, piemēram, lai attiecībā uz vairošanos līdz minimumam samazinātu sistemātisko novirzi trauku novietojuma dēļ.

Aerācija

44. Virsējo ūdeni testēšanas traukos viegli aerē (piemēram, 2–4 burbuļi sekundē), izmantojot Pastēra pipeti, kas novietota apmēram 2 cm virs sedimentu virsmas, lai līdz minimumam samazinātu sedimentu uzduļķošanu. Jāraugās, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nesamazinās zem 30 % gaisa piesātinājuma vērtības (*ASV*). Gaisa padeve jāpārbauda un, ja nepieciešams, jākoriģē vismaz reizi darba dienā.

Ūdens kvalitāte

45. Virsējam ūdenim jāmēra šādi ūdens kvalitātes parametri.

Temperatūra:	vienreiz nedēļā un ekspozīcijas perioda sākumā un beigās vismaz vienā testēšanas traukā katram koncentrācijas līmenim un vienā kontrolgrupas testēšanas traukā; ja iespējams, papildus var reģistrēt apkārtējās vides temperatūru (apkārtējā gaisā vai ūdens peldē), piemēram, ik pēc stundas.

▼M6

Izšķīdušā skābekļa saturs:	vienreiz nedēļā un ekspozīcijas perioda sākumā un beigās vismaz vienā testēšanas traukā katram koncentrācijas līmenim un vienā kontrolgrupas testēšanas traukā; izsaka mg/l un % *ASV* (gaisa piesātinājuma vērtība).
Gaisa piegāde:	kontrolē vismaz vienreiz darba dienā un, ja nepieciešams, koriģē.
pH:	vienreiz nedēļā un ekspozīcijas perioda sākumā un beigās vismaz vienā testēšanas traukā katram koncentrācijas līmenim un vienā kontrolgrupas testēšanas traukā.
Kopējā ūdens cietība:	ekspozīcijas perioda sākumā un beigās vismaz vienā kontrolgrupas paraugā un vienā testēšanas traukā ar augstāko koncentrāciju; izsaka mg/l $CaCO_3$.
Kopējais amonjaka saturs:	ekspozīcijas perioda sākumā un turpmāk 3x nedēļā vismaz vienā kontrolgrupas replikātā un vienā testēšanas traukā katram koncentrācijas līmenim; izsaka mg/l NH_4^+ vai NH_3, vai kā kopējo amonjaka slāpekli.

Ja ūdens kvalitātes parametru mērījumiem ūdens paraugi no traukiem jānolej lielā daudzumā, ūdens kvalitātes mērījumiem var būt ieteicams sagatavot atsevišķu trauku, lai nemainītu ūdens un sedimentu tilpuma attiecību.

Bioloģiskie novērojumi

46. Ekspozīcijas laikā testēšanas trauki jānovēro, lai salīdzinājumā ar kontrolgrupas paraugiem vizuāli novērtētu tārpu izturēšanās izmaiņas (piemēram, vairīšanās no sedimentiem, sedimentu virskārtā redzamas fekāliju granulas). Novērojumi jāpieraksta.

47. Testēšanas beigās aplūko katru replikātu (var nepārbaudīt papildu traukus, kas paredzēti ķīmiskajām analīzēm). Visi tārpi no testēšanas traukiem jāizņem ar piemērotu paņēmienu. Jāraugās, lai izņemtie tārpi netiktu savainoti. Viena iespējama metode ir tārpu izsijāšana no sedimentiem. Var izmantot nerūsošā tērauda sietu ar atbilstošu acu izmēru. Lielāko daļu virsējā ūdens uzmanīgi nolej un atlikušos sedimentus un ūdeni samaisa, iegūstot biezu suspensiju, ko var laist caur sietu. Izmantojot 500 μm sietu, lielākā daļa sedimentu daļiņu caur sietu izkļūst ļoti ātri; tomēr laišana caur sietu jāveic ātri, lai tārpi neierāptos sietā vai neizkļūtu tam cauri. Ja izmanto 250 μm sietu, tārpi nevarēs ierāpties sietā vai izkļūt tam cauri, tomēr jāraugās, lai sietā paliek iespējami maz sedimentu daļiņu. Katra replikātu trauka izsijāto biezo suspensiju var izlaist caur sietu otru reizi, lai pārliecinātos, ka ir savākti visi tārpi. Alternatīva metode varētu būt sedimentu uzsildīšana, testēšanas traukus novietojot ūdens peldē 50–60 °C temperatūrā; tārpi atstās sedimentus un tos no sedimentu virskārtas varēs savākt, izmantojot rūdīta stikla pipeti ar platu galu. Vēl viena alternatīva metode varētu būt biezas sedimentu suspensijas pagatavošana un izliešana seklā attiecīga izmēra pannā. No biezās suspensijas seklā slāņa tārpus var uzlasīt ar tērauda adatu vai smalku pinceti (izmanto vairāk kā dakšu, nevis kā knaibles, lai tārpus nesavainotu) un pārvietot tīrā ūdenī. Pēc tārpu atdalīšanas no sedimentu suspensijas tos noskalo testēšanas vidē un saskaita.

48. Neatkarīgi no izmantotās testēšanas metodes laboratorijām jāpierāda, ka to personāls ir spējīgs savākt vidēji vismaz 90 % organismu no visiem

▼M6

sedimentiem. Piemēram, kontrolgrupas sedimentiem vai testa sedimentiem var pievienot noteiktu skaitu testa organismu un pēc vienas stundas noteikt savākšanas rādītāju(7).

49. Jāreģistrē un jānovērtē kopējais dzīvo un mirušo īpatņu skaits uz replikātu. Par mirušiem uzskata tārpus, kas atbilst šādiem kritērijiem:

a) pēc viegla mehāniska stimula nav reakcijas;

b) ir sadalīšanās pazīmes (kombinācijā ar "a");

c) trūkstošie tārpi.

Turklāt dzīvos tārpus var iedalīt vienā no trīs grupām:

a) lieli, veseli tārpi (pieaugušie) bez reģenerētām ķermeņa daļām;

b) veseli tārpi ar reģenerētām gaišākas krāsas ķermeņa daļām (piemēram, ar jaunu pakaļdaļu, ar jaunu priekšdaļu vai arī gan jaunu pakaļdaļu, gan priekšdaļu);

c) neveseli tārpi (t. i., nesen fragmentēti tārpi ar nereģenerētām ķermeņa daļām).

Šie papildu novērojumi nav obligāti, bet var tikt izmantoti bioloģisko rezultātu papildu interpretēšanā (piemēram, liels c) grupā iedalīto tārpu skaits var liecināt, ka konkrētā apstrāde kavē vairošanos vai reģenerāciju). Turklāt jāreģistrē arī jebkādas izskata atšķirības (piemēram, ārējā apvalka bojājumi, pietūkušas ķermeņa daļas) starp apstrādes grupas un kontrolgrupas tārpiem, ja tādas tiek novērotas.

50. Uzreiz pēc saskaitīšanas/novērtēšanas katru dzīvo tārpu no katra replikāta pārvieto sausās, iepriekš nosvērtās un marķētās svēršanas pannās (vienu uz replikātu) un nonāvē ar vienu pilienu etanola uz svēršanas pannu. Svēršanas pannas uz nakti žūšanai novieto žāvēšanas krāsnī 100 ± 5 °C temperatūrā, pēc tam tās atdzesē eksikatorā un nosaka tārpu saussvaru (vēlams, g ar vismaz četriem cipariem aiz komata).

51. Lai būtu ņemtas vērā neorganiskās sastāvdaļas, kas tārpu gremošanas traktā nokļuvušas no apēstajiem sedimentiem, papildus kopējam saussvaram atbilstoši aprakstam literatūras avotā (49) var noteikt arī bezpelnu saussvaru.

52. Biomasu nosaka kā kopējo biomasu uz replikātu, ieskaitot pieaugušos un jaunos tārpus. Nosakot biomasu uz replikātu, mirušos tārpus neņem vērā.

Testējamo ķīmisko vielu koncentrāciju verificēšana

Paraugu ņemšana

53. Paraugi testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajai analīzei jāņem vismaz augstākajā koncentrācijā un kādā zemākā koncentrācijā, vismaz līdzsvarošanās fāzes beigās (pirms testa organismu pievienošanas) un testēšanas beigās. Analīzei ņem paraugus vismaz no sedimentu masas un virsējā ūdens. Katrā paraugu ņemšanas datumā ņem vismaz divus paraugus no kontrolgrupas un no katras apstrādes grupas. Vienu no dublikātparaugiem var glabāt rezervē (lai to analizētu, piemēram, gadījumā, ja sākotnējā analīze neiekļaujas ± 20 % robežās no nominālās koncentrācijas). Specifisku

▼M6

ķīmisko īpašību gadījumā, piemēram, paredzama strauja testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās, analīzes grafiku pēc eksperta uzskatiem var pārplānot (piemēram, biežāka paraugu ņemšana, papildu koncentrācijas līmeņu analīze). Tad paraugus var ņemt paraugu ņemšanas starpdatumos (piemēram, septītajā dienā pēc ekspozīcijas sākšanas).

54. Virsējā ūdens paraugs jāiegūst, to uzmanīgi nolejot vai nolaižot caur sifonu, lai sedimentu uzduļķošanos samazinātu līdz minimumam. Jāatzīmē paraugu tilpums.

55. Pēc tam, kad virsējais ūdens ir aizvākts, sedimenti jāhomogenizē un jāpārvieto uz piemērotu konteineru. Mitro sedimentu svaru atzīmē.

56. Ja papildus nepieciešams testējamo ķīmisko vielu analizēt poru ūdenī, homogenizēto un nosvērto sedimentu paraugi jācentrifugē, lai iegūtu poru ūdeni. Piemēram, 250 ml centrifugēšanas mērglāzēs iepilda apmēram 200 ml mitru sedimentu. Pēc tam paraugus bez filtrēšanas centrifugē, lai izolētu poru ūdeni, piemēram, 10 000 ± 600 × g 30 – 60 min temperatūrā, kas nepārsniedz testēšanā izmantoto temperatūru. Pēc centrifugēšanas virspusē esošo ūdeni nolej vai ar pipeti nosūc, gādājot, lai tajā nenonāk sedimentu daļiņas, un tilpumu atzīmē. Atzīmē atlikušo sedimentu granulu svaru. Sedimentu saussvara noteikšana katrā paraugu ņemšanas datumā var palīdzēt aplēst masas bilanci vai testējamās ķīmiskās vielas atgūstamību ūdens-sedimentu sistēmā. Dažos gadījumos var nebūt iespējams analizēt koncentrācijas poru ūdenī, jo parauga apjoms ir pārāk mazs.

57. Ja analīzi neveic uzreiz, visi paraugi jāglabā saskaņā ar piemērotu metodi, piemēram, glabāšanas apstākļos, kas ieteicami, lai testējamā ķīmiskā viela noārdītos minimāli (piemēram, vides paraugus parasti glabā tumsā – 18 °C temperatūrā). Pirms pētījuma uzsākšanas iegūst informāciju par konkrētās testējamās ķīmiskās vielas pareizas glabāšanas apstākļiem, piemēram, glabāšanas ilgumu un temperatūru, ekstrakcijas procedūrām u. tml.

Analīzes metode

58. Tā kā visu procedūru būtībā nosaka testējamajai ķīmiskajai vielai izmantotās analītiskās metodes pareizība, precizitāte un jutība, eksperimentāli pārbauda, vai ar konkrēto metodi apmierinoša ir ķīmiskās analīzes precizitāte un reproducējamība, kā arī testējamās vielas atgūstamība no ūdens un sedimentu paraugiem vismaz zemākajās un augstākajās testa koncentrācijās. Pārbauda arī, vai testējamā ķīmiskā viela kontrolkamerās nav konstatējama koncentrācijās, kas pārsniedz kvantitatīvās noteikšanas robežu. Ja nepieciešams, koriģē nominālās koncentrācijas attiecībā uz vielas atgūstamību ar kvalitātes kontroles paraugiem, kas papildināti ar testējamo vielu (piemēram, ja atgūstamība ir ārpus 80 – 120 % no papildinātā daudzuma). Testēšanas laikā ar visiem paraugiem rīkojas tā, lai līdz minimumam samazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, tos, kas rodas, testējamai ķīmiskajai vielai adsorbējoties uz paraugu ņemšanas ierīces).

59. Jāatzīmē un pārskatā jāatspoguļo testējamās ķīmiskās vielas atgūstamība, kvantitatīvās noteikšanas robeža un noteikšanas robeža sedimentos un ūdenī.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

60. Galvenie, obligātie testa atbildreakcijas mainīgie, kas statistiski jāizvērtē, ir biomasa un kopējais tārpu skaits uz replikātu. Nav obligāti, bet var izvērtēt arī vairošanos (tārpu skaita palielināšanos) un augšanu (sausās biomasas palielināšanos). Tādā gadījumā tārpu saussvara aplēses ekspozīcijas sākumā jāiegūst, piemēram, no sinhronizētu testēšanai paredzēto tārpu partijas reprezentatīva apakšparauga saussvara mērījuma.

▼M6

61. Lai gan neizdzīvošana nav šā testa beigupunkts, tā iespējami jāizvērtē. Mirstības skaitliskā novērtēšanā par mirušiem uzskata tārpus, kas nereaģē uz vieglu mehānisku kairinājumu, kam vērojamas sadalīšanās pazīmes, un trūkstošos tārpus. Mirstība vismaz jāatzīmē un jāņem vērā testēšanas rezultātu interpretācijā.

62. Ietekmes koncentrācijas jāizsaka mg uz kg sedimentu saussvara. Ja testējamās ķīmiskās vielas atgūstamība sedimentos vai sedimentos un virsējā ūdenī ekspozīcijas sākumā ir 80 līdz 120 % no nominālajām koncentrācijām, ietekmes koncentrācijas (EC_x, *NOEC*, *LOEC*) var izteikt, pamatojoties uz nominālajām koncentrācijām. Ja atgūstamība no nominālajām koncentrācijām atšķiras par vairāk nekā ± 20 %, ietekmes koncentrāciju (EC_x, *NOEC*, *LOEC*) pamatā jābūt sākotnēji izmērītajām koncentrācijām ekspozīcijas sākumā, piemēram, ņemot vērā testējamās ķīmiskās vielas masas bilanci testēšanas sistēmā (sk. 30. punktu). Tādos gadījumos, lai apstiprinātu, ka testa sedimenti pagatavoti pareizi, papildu informāciju var iegūt, analizējot izejšķīdumu un/vai lietotos šķīdumus.

EC_x:

63. EC_x vērtības 60. punktā aprakstītajiem parametriem aprēķina, izmantojot attiecīgas statistiskas metodes (piemēram, varbūtību analīzi, logistisko vai Veibula funkciju, saīsināto Spīrmena-Kerbera metodi vai vienkāršu interpolāciju). Norādījumi par statistisko izvērtēšanu sniegti literatūras avotos (15) un (50). EC_x iegūst, iegūtajā vienādojumā ievietojot vērtību, kas atbilst x % kontroles vidējās vērtības. Lai aprēķinātu EC_{50} vai jebkādu citu EC_x, katras apstrādes vidējai vērtībai ($\overline{X}$) jāveic regresijas analīze.

NOEC/LOEC

64. Ja ar statistisku analīzi paredzēts noteikt *NOEC/LOEC*, ir nepieciešama statistika par katru trauku (atsevišķos traukus uzskata par replikātiem). Jāizmanto attiecīgas statistiskas metodes. Vispār testējamā vienuma nelabvēlīgos efektus salīdzinājumā ar kontrolgrupu pēta, izmantojot vienvirziena (mazāku) hipotēzes pārbaudi pie $p \leq 0,05$. Piemēri ir sniegti turpmākajos punktos. Norādījumi par statistikas metožu izraudzīšanos sniegti avotos (15) un (50).

65. Normālsadalījuma datus var pārbaudīt, piemēram, ar Kolmogorova-Smirnova piemērotības testu *(Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit-test)*, intervāla un standartnovirzes attiecības testu (R/s testu) vai Šapiro-Vilka testu *(Shapiro-Wilk test)* (divvirzienu, $p \leq 0,05$). Kohreina testu *(Cochran's test)*, Levena testu vai Bartleta testu *(Bartlett's test)* (divvirzienu, $p \leq 0,05$) var izmantot, lai pārbaudītu dispersijas homogēniskumu. Ja parametriskās pārbaudes procedūras priekšnosacījumi (normalitāte, dispersijas homogēniskums) ir izpildīti, var veikt vienvirziena dispersijas analīzi *(ANOVA)* un turpmākus daudzpusējas salīdzināšanas testus. Pāru salīdzinājumus (piemēram, Daneta t-testu) vai descendentās tendences testus (piemēram, Viljamsa testu) var izmantot, lai aprēķinātu, vai ir būtiskas atšķirības ($p \leq 0,05$) starp kontrolparaugiem un dažādām testējamo vienumu koncentrācijām. Citos gadījumos *NOEC* un *LOEC* aprēķināšanai jāizmanto neparametriskās metodes (piemēram, Bonferoni U-tests pēc Holmsa vai Džonkhīra-Terpstras trenda tests).

Robežtests

66. Ja ir veikts robežtests (kontrolparauga un tikai viena apstrādes parauga salīdzinājums) un ir izpildīti parametrisko testēšanas procedūru priekšnosacījumi (normalitāte, homogēniskums), metriskās atbildreakcijas (kopējo tārpu skaitu un tārpu sausajā svarā izteiktu biomasu) var izvērtēt pēc Stjūdenta testa (t-testa). Ja šīs prasības neizpildās, var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas Velča t-testu (*Welch t-test*) vai neparametrisku testu, piemēram, Manna-Vitnija U-testu. Informācija par metodes starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā hipotēzes pārbaudē atklāto statistisko jaudu ir sniegta 6. papildinājumā.

▼M6

67. Lai noteiktu būtiskas atšķirības starp kontrolgrupām (kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu), katras kontrolgrupas replikātus var testēt, kā tas aprakstīts robežtestā. Ja šajos testos netiek atklātas būtiskas atšķirības, visus kontrolgrupas un šķīdinātāja kontrolgrupas paraugus var apkopot. Citādi visi apstrādes paraugi jāsalīdzina ar šķīdinātāja kontrolgrupu.

Rezultātu interpretācija

68. Ja notikusi atkāpšanās no šīs testēšanas metodes un ja mērīto testa koncentrāciju vērtība ir tuvu izmantotās analītiskās metodes noteikšanas robežai, rezultāti jāinterpretē piesardzīgi. Jebkāda atkāpšanās no šīs testēšanas metodes jāatzīmē.

Testēšanas pārskats

69. Testēšanas pārskatā jāiekļauj vismaz šāda informācija.

— *Testējamā ķīmiskā viela:*

— ķīmiskās identifikācijas dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, *CAS* numurs utt.), ietverot tīrību un analītisko metodi, ar ko ir iespējams testējamo ķīmisko vielu noteikt kvantitatīvi; testējamās ķīmiskās vielas avots, jebkādi izmantoto šķīdinātāju identifikācijas dati un koncentrācija;

— jebkāda informācija, kas pieejama par fizikālajām un fizikālķīmiskajām īpašībām un iegūta pirms testēšanas sākšanas (piemēram, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, sadalīšanās koeficients augsnē (vai sedimentos, ja zināms), log K_{ow}, stabilitāte ūdenī u. c.).

— *Testa sugas:*

— zinātniskais nosaukums, izcelsmes avots, jebkāda iepriekšēja apstrāde, aklimatizācija, kultivēšanas apstākļi u. c.

— *Testēšanas apstākļi:*

— izmantotā testēšanas procedūra (piemēram, statiska, pusstatiska vai ar caurplūdi);

— testēšanas plāns (piemēram, testēšanas kameru skaits, materiāls un izmērs, ūdens tilpums uz trauku, sedimentu masa un tilpums uz trauku, (caurplūdes vai pusstatiskajām metodēm – ūdens tilpuma nomaiņas ātrums), jebkāda aerēšana pirms testēšanas un tās laikā, paraugu skaits, tārpu skaits uz replikātu ekspozīcijas sākumā, testa koncentrāciju skaits, nogatavināšanas, līdzsvarošanās un ekspozīcijas periodu ilgums, paraugu ņemšanas biežums);

— sedimentu un virsējā ūdens dziļums;

— testējamās ķīmiskās vielas priekšapstrādes un papildināšanas/ievadīšanas metode;

— nominālās testēšanas koncentrācijas, detalizēta informācija par paraugu ņemšanu ķīmiskajai analīzei un analīzes metodes, ar kādām iegūtas testējamo ķīmisko vielu koncentrācijas;

— sedimentu raksturlielumi atbilstoši 24. – 25. punkta aprakstam un jebkādi citi veikti mērījumi; pagatavoto sedimentu gatavošana;

— testēšanas ūdens pagatavošana (ja izmanto rekonstituētu ūdeni) un rādītāji (skābekļa koncentrācija, pH, vadītspēja, cietība un jebkādi citi veiktie mērījumi) pirms testēšanas sākuma;

— detalizēta informācija par barošanu, arī par barības veidu, pagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu;

▼**M6**

— gaismas intensitāte un fotoperiods(-i);

— visu bioloģisko parametru (piemēram, paraugu ņemšana, izmeklēšana, testa organismu svēršana) un visu abiotisko parametru (piemēram, ūdens un sedimentu kvalitātes parametri) noteikšanā izmantotās metodes;

— visu ķīmiskās analīzes paraugu tilpums un/vai svars;

— detalizēta informācija par visu ķīmiskās analīzes paraugu apstrādi, arī par sagatavošanas, glabāšanas un papildināšanas procedūrām, ekstrakciju un analīzes procedūrām (un precizitāti) attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu, kā arī testējamās ķīmiskās vielas atgūšanas reizēm.

— *Rezultāti:*

— ūdens kvalitāte testēšanas traukos (pH, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, cietība, amonjaka koncentrācijas un jebkādi citi veiktie mērījumi);

— kopējā organiskā oglekļa (*TOC*) saturs, saussvara attiecība pret slapjo svaru, sedimentu pH un jebkādi citi veiktie mērījumi;

— kopējais tārpu skaits un, ja noteikts, veselo un neveselo tārpu skaits katrā testēšanas kamerā testēšanas beigās;

— tārpu saussvars katrā testēšanas kamerā testēšanas beigās un, ja izmērīts, tārpu apakšparauga saussvars testēšanas sākumā;

— jebkādas novērotas uzvedības anomālijas salīdzinājumā ar kontrolgrupu (piemēram, vairīšanās no sedimentiem, ir vai nav fekālās granulas);

— jebkādi novēroti nāves gadījumi;

— toksisko beigupunktu aplēses (piemēram, EC_x, *NOEC* un/vai *LOEC*), kā arī to noteikšanai izmantotās statistiskas metodes;

— nominālās testēšanas koncentrācijas, izmērītās testēšanas koncentrācijas un rezultāti, kas gūti analīzēs, kurās nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju testēšanas traukā;

— jebkādas novirzes no derīguma kritērijiem.

— *Rezultātu izvērtēšana:*

— rezultātu atbilstība 13. punktā norādītajiem derīguma kritērijiem;

— rezultātu iztirzājums, arī jebkāda ietekme uz testēšanas rezultātiem sakarā ar atkāpēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) EC (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. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.

(2) 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.

▼**M6**

(3) 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.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) 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.

(6) Šā pielikuma C.27. nodaļa "Toksicitātes tests ar nosēdumu un ūdens hironomīdiem, izmantojot piesātinātus nosēdumus" .

(7) 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.

(8) 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.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) 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.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 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. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) 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.

(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; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., 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., & Liu D.H.W. (1980). Lumbriculus variegatus, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼M6

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & 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. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & 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. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & 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. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 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. 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.

(23) Kukkonen, J. and 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. & 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. & 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., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of Lumbriculus variegatus Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) 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.

(28) 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 non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) 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.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of 14C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete Lumbriculus variegatus in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) 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.

(34) Dermott R. & 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. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Šā pielikuma C.1. nodaļa "Akūtā toksicitāte zivīm".

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) 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.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) 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.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (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. & 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. & 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. & 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. & 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, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von Lumbriculus variegatus. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Additional literature on statistical procedures:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 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 (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. 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. & 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. papildinājums

Definīcijas

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini:

Ķīmiskā viela ir viela vai vielu maisījums.

Nogatavināšanas periodu izmanto, lai stabilizētu sedimentu mikrobiālo komponenti un atbrīvotos, piemēram, no amonjaka, kas rodas no sedimentu sastāvdaļām; tas notiek pirms sedimentu papildināšanas ar testējamo ķīmisko vielu. Parasti pēc nogatavināšanas virsējo ūdeni nolej.

EC_x ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija sedimentos, kas rada x % (piemēram, 50 %) ietekmi uz bioloģisko parametru noteiktā ekspozīcijas periodā.

Līdzsvarošanās periodu izmanto, lai testējamai ķīmiskajai vielai ļautu sadalīties starp cieto fāzi, poru ūdeni un virsējo ūdeni; tas notiek pēc sedimentu papildināšanas ar testējamo ķīmisko vielu un pirms testa organismu pievienošanas.

Ekspozīcijas fāze ir laiks, kurā testa organismi ir eksponēti testējamai ķīmiskajai vielai.

Pagatavotie sedimenti jeb rekonstituētie, mākslīgie vai sintētiskie sedimenti ir materiālu maisījums, ar ko atdarina dabisko sedimentu fizikālās sastāvdaļas.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija *(LOEC)* ir zemākā testētā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, pie kuras tai ir konstatēta būtiska toksiska ietekme (pie $p < 0,05$) salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Tomēr visām testa koncentrācijām, kas pārsniedz *LOEC*, jāuzrāda ietekme, kas ir vienāda ar ietekmi, kura novērojama pie *LOEC*, vai lielāka par to. Ja šos divus nosacījumus apmierināt nav iespējams, izsmeļoši jāizskaidro, kāpēc izraudzīta šāda *LOEC* (un attiecīgi *NOEC*).

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija *(NOEC)* ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kura ir tieši zem *LOEC* vērtības un kurai salīdzinājumā ar kontrolgrupu attiecīgajā ekspozīcijas periodā nav statistiski būtiskas ietekmes ($p < 0,05$).

Oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}; dažkārt izsaka arī kā P_{ow}) ir ķīmiskās vielas šķīdības n-oktanolā un ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī, un tas atspoguļo ķīmiskās vielas lipofilitāti (šā pielikuma A.24. nodaļa). K_{ow} vai tā logaritmu ($\log K_{ow}$) izmanto par rādītāju ķīmiskās vielas bioakumulācijas potenciālam ūdens organismos.

Organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{oc}) ir attiecība starp ķīmiskās vielas koncentrāciju sedimentu organiskā oglekļa frakcijā vai uz tās un šīs vielas koncentrāciju ūdenī līdzsvara stāvoklī.

Virsējais ūdens ir ūdens, ar ko testēšanas traukā nosegti sedimenti.

Poru ūdens jeb starpūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp sedimentu vai augsnes daļiņām.

Papildināti sedimenti ir sedimenti, kam pievienota testējamā ķīmiskā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai vielu maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼**M6**

2. papildinājums

Ieteicamais rekonstituētā ūdens sastāvs

(aizgūts no šā pielikuma C.1. nodaļas (1))

a) *Kalcija hlorīda šķīdums*

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l

b) *Magnija sulfāta šķīdums*

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l

c) *Nātrija bikarbonāta šķīdums:*

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 2,59 g $NaHCO_3$ dejonizētā ūdenī, ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l

d) *Kālija hlorīda šķīdums*

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 0,23 g KCl dejonizētā ūdenī, ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l

Visām ķīmiskajām vielām jābūt analītiski tīrām.

Destilētā vai dejonizētā ūdens vadītspēja nedrīkst pārsniegt 10 μScm^{-1}.

Samaisa 25 ml katra a)–d) šķīduma, un kopējo tilpumu līdz 1 l papildina ar dejonizētu ūdeni. Kalcija un magnija jonu summa šajos šķīdumos ir 2,5 mmol/l.

Ca:Mg jonu proporcija ir 4:1, bet Na:K joniem – 10:1. Šā šķīduma skābju neitralizētspēja $K_{S4.3}$ ir 0,8 mmol/l.

Atšķaidīšanas ūdeni aerē, līdz sasniedz piesātinājumu ar skābekli, tad pirms izmantošanas aptuveni divas dienas glabā bez turpmākas aerācijas.

ATSAUCE

(1) Šā pielikuma nodaļa C.1 “Akūtā toksicitāte zivīm”

▼**M6**

3. papildinājums

Pieņemama atšķaidīšanas ūdens fizikālķīmiskās īpašības

Sastāvdaļa	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 μg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 μg/l
Atlikušais hlors	< 10 μg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l
(aizgūts no ESAO (1992) (1))	

ATSAUCE

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

4. papildinājums

Ieteicamie mākslīgie sedimenti – pagatavošanas un glabāšanas norādījumi

Sedimentu sastāvdaļas

Sastāvdaļa	Raksturojums	% sedimentu saussvara
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, sadalīšanās pakāpe: "vidēja", gaisā žāvēta, bez redzamām augu paliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvarca smiltis	Graudu izmērs: ≤ 2 mm, bet > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā	75–76
Kaolīna māli	Kaolinīta saturs ≥ 30 %	20 ± 1
Barības avots	piemēram, nātru pulveris (Folia urticae), lielās nātres (Urtica dioica) lapas, smalki samaltas (daļiņu izmērs ≤ 0,5 mm); saskaņā ar farmācijas standartiem, lietošanai pārtikā; papildus sausiem sedimentiem	0,4–0,5 %
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdru un smiltis	2 ± 0,5
Kalcija karbonāts	$CaCO_3$, pulverveida, ķīmiski tīrs, papildus sausajiem sedimentiem	0,05–1
Dejonizēts ūdens	Vadītspēja≤ 10 μS/cm, papildus sausajiem sedimentiem	30–50

Piezīme. Ja paredzama paaugstināta amonjaka koncentrācija, piemēram, ja zināms, ka testējamā ķīmiskā viela aizkavē nitrifikāciju, varētu būt lietderīgi 50 % ar slāpekli bagātā *Urtica* pulvera aizstāt ar celulozi (piemēram, ar α-celulozes pulveri, kas ir ķīmisku tīrs, daļiņu izmērs ≤ 0,5 mm(1) (2)).

Pagatavošana

Kūdru izžāvē gaisā un samaļ smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH ar $CaCO_3$ koriģē līdz vērtībai 5,5 ± 0,5. Suspensiju gatavo vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobiālo komponenti. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt 6,0 ± 0,5. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu viendabīgus sedimentus ar ūdens saturu diapazonā 30–50 % no sedimentu saussvara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un, ja nepieciešams, to ar $CaCO_3$ koriģē līdz vērtībai 6,5–7,5. Tomēr, ja ir paredzama amonjaka producēšanās, varētu būt lietderīgi gādāt, lai sedimentu pH ir zem 7,0 (piemēram, no 6,0 līdz 6,5). Sedimentu paraugus ņem, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Ja paredzams, ka veidosies amonjaks,

▼M6

pagatavotos sedimentus, pirms tos papildina ar testējamo ķīmisko vielu, septiņas dienas var nogatavināt tādos pašos apstākļos, kādus rada turpmākajam testam (piemēram, ar sedimentu un ūdens attiecību 1:4 un tādu pašu sedimentu slāņa augstumu kā testēšanas traukos) t. i., tie ir jāpārlej ar ūdeni, kuru iepriekš aerē. Nogatavināšanas perioda beigās virsējo ūdeni nolej un izlej. Pēc tam papildinātās kvarca smiltis katram apstrādes līmenim sajauc ar sedimentiem, sedimentus sadala pa replikātu testēšanas traukiem, pārlejot ar testēšanas ūdeni. Tad šos traukus inkubē tādos pašos apstākļos, kādus rada turpmākajam testam. Tajā brīdī sākas līdzsvarošanas periods. Virsējais ūdens jāaerē.

Izraudzīto barības avotu pievieno pirms sedimentu papildināšanas ar testējamo ķīmisko vielu vai tās laikā. Tos var iepriekš samaisīt ar kūdras suspensiju (sk. iepriekš). Savukārt, iespējami saīsinot periodu starp barības pievienošanu un ekspozīcijas sākumu, var novērst, ka barības avots pārlieku noārdās pirms testa organismu pievienošanas – piemēram, ilga līdzsvarošanas perioda gadījumā. Lai nodrošinātu, ka barība ir papildināta ar testējamo ķīmisko vielu, barības avots ar sedimentiem jāsajauc ne vēlāk kā dienā, kad sedimentus papildina ar testējamo ķīmisko vielu.

Glabāšana

Mākslīgo sedimentu sausās sastāvdaļas var glabāt sausā, vēsā vietā vai istabas temperatūrā. Pagatavotie ar testējamo ķīmisko vielu papildinātie sedimenti testēšanā jāizmanto uzreiz. Papildināto sedimentu paraugus konkrētajai testējamajai ķīmiskajai vielai ieteiktajos apstākļos var glabāt līdz analīzes veikšanai.

ATSAUCES

(1) 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.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von Lumbriculus variegatus. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

5. papildinājums

***Lumbriculus variegatus* kultivēšanas metodes**

Lumbriculus variegatus (Müller), slieku dzimta *(Lumbriculidae),* mazsartārpu klase *(Oligochaeta)* apdzīvo saldūdens sedimentus, un to plaši izmanto ekotoksikoloģiskajā testēšanā. To var viegli kultivēt laboratorijas apstākļos. Turpmāk sniegts kultivēšanas metožu pārskats.

Kultivēšanas metodes

Lumbriculus variegatus kultivēšanas apstākļi ir detalizēti aprakstīti *Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4).* Turpmāk sniegts īss kopsavilkums par šiem apstākļiem. *L. variegatus* būtiska priekšrocība ir šīs sugas ātrā vairošanās, kas rezultējas straujā biomasas pieaugumā laboratorijā kultivētās populācijās (piemēram, (1), (3), (4), (5)).

Tārpus var kultivēt lielos akvārijos (57–80 l) 23 °C temperatūrā ar fotoperiodu 16 h gaisma: 8 h tumsa (100–1 000 lx), izmantojot ik dienas atjauninātu dabisko ūdeni (45–50 l uz vienu akvāriju). Substrātu pagatavo, nebalināta brūnā papīra dvieļus sagriežot strēmelēs, ko pēc tam var dažas sekundes sakult ar kultūras ūdeni, iegūstot nelielu papīra gabaliņu substrātu. Šo substrātu pēc tam var tieši izmantot *Lumbriculus* kultūras akvārijā, ar to izklājot tvertnes apakšdaļu, vai arī dejonizētā ūdenī sasaldētu glabāt vēlākai lietošanai. Ar jauno substrātu tvertnē pietiek apmēram divus mēnešus.

Katru tārpu kultūru sāk ar 500–1 000 tārpiem un trīs reizes nedēļā, nodrošinot ūdens atjaunināšanu vai caurplūdi, baro ar 10 ml suspensiju, kas satur 6 g foreļu kāpuru barības. Lai nepieļautu baktēriju un sēnīšu augšanu, statiskās vai pusstatiskās kultūrās barību dod retāk.

Šādos apstākļos īpatņu skaits kultūrā aptuveni 10 līdz 14 dienās parasti dubultojas.

Alternatīvi *Lumbriculus variegatus* var kultivēt arī sistēmā, kas sastāv no kvarca smilšu slāņa, ko izmanto kā mākslīgos sedimentus (1–2 cm dziļumā), un reģenerēta ūdens. Par kultivēšanas traukiem var izmantot 12 līdz 20 cm augstus stikla vai nerūsošā tērauda konteinerus. Ūdens slāni viegli aerē (piemēram, 2 burbulīši sekundē) ar Pastēra pipeti, kas novietota apmēram 2 cm virs sedimentu virskārtas. Lai izvairītos no, piem., amonjaka uzkrāšanās, virsējais ūdens jānomaina, izmantojot caurplūdes sistēmu, vai manuāli vismaz reizi nedēļā. Mazsartārpus var turēt istabas temperatūrā fotoperiodā ar 16 gaišajām stundām (intensitāte – 100–1 000 luksi) un 8 tumšajām stundām. Pusstatiskās kultūrās (ūdens atjaunināšana reizi nedēļā) tārpus divreiz nedēļā baro ar *TetraMin* (piemēram, 0,6–0,8 mg uz cm^2 sedimentu virsmas), ko var ievadīt suspensijas veidā – 50 mg *TetraMin* uz ml dejonizēta ūdens.

Lumbriculus variegatus no kultūrām izņem, piemēram, uz atsevišķu vārglāzi ar smalku tīkliņu pārvietojot substrātu vai ar rūdīta stikla pipeti ar platu galu (apmēram 5 mm diametrā) – organismus. Ja pārvietošanas laikā vārglāzē nonāk substrāts, tārpus un substrātu saturošo vārglāzi pa nakti atstāj caurplūdē, kura substrātu atdalīs no vārglāzes, tārpiem paliekot trauka apakšdaļā. Pēc tam tārpus var ielaist kultivēšanas tvertnēs, kas sagatavotas no jauna, vai tālāk sagatavot testa vajadzībām, kā tas aprakstīts literatūras avotos (3) un (4) vai turpmāk.

Problēma, kas kritiski jāvērtē, sedimentu testos izmantojot *L. variegatus*, ir sugas vairošanās veids (piemēram, arhitomija vai morfolakse (6)). Šāda bezdzimumvairošanās rezultējas divos fragmentos, kuri kādu laiku neuzņem barību, kamēr reģenerējas galvas vai astes daļa (piem., (7), (8)). Tas nozīmē, ka *L. variegatus* nav barošanās ceļā pastāvīgi eksponēti piesārņotiem sedimentiem.

▼**M6**

Tāpēc jāveic sinhronizācija, lai līdz minimumam samazinātu nekontrolētu vairošanos un reģenerēšanos un tātad augstu testēšanas rezultātu izkliedi. Šādas atšķirības var rasties tad, ja daži īpatņi, kas sadalījušies fragmentos un tādēļ noteiktu laiku neuzņem barību, testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai ir eksponēti mazāk, nekā citi īpatņi, kas testēšanas laikā fragmentos nesadalās (9), (10), (11). 10 līdz 14 dienas pirms ekspozīcijas sākuma tārpi ir jāsadala mākslīgi (sinhronizācija). Sinhronizācijai jāizraugās lieli (pieauguši) tārpi, kam, vēlams, nav nesenas morfolakses pazīmju. Šos tārpus var novietot uz stikla priekšmetstikliņa ar pilienu kultūras ūdens, un ķermeņa vidusdaļā ar skalpeli pārdalīt uz pusēm. Jāraugās, lai pakaļgali būtu vienāda izmēra. Pēc tam pakaļgalus jaunu galvu reģenerēšanai līdz ekspozīcijas sākumam atstāj kultivēšanas traukos, kas satur tādu pašu substrātu, kāds izmantots kultūrā, un rekonstituētu ūdeni. Par jaunu galvu reģenerēšanos liecina sinhronizēto tārpu ierakšanās substrātā (reģenerēto galvu esamību var pārbaudīt, reprezentatīvu apakšparaugu apskatot binokulārā mikroskopā). Pēc tam sagaidāms, ka testa organismi būs vienādā fizioloģiskā stāvoklī. Tas nozīmē, ka, kad testēšanas laikā sinhronizētajiem tārpiem notiek morfolakses izraisītā reģenerācija, sagaidāms, ka praktiski visi dzīvnieki papildinātajiem sedimentiem bijuši eksponēti vienādā mērā. Sinhronizētie tārpi jābaro vienreiz, tiklīdz tārpi sāk ierakties substrātā vai septiņas dienas pēc to sadalīšanas. Barošanas režīmam jābūt salīdzināmam ar parastajām kultūrām, taču sinhronizētos tārpus ieteicams barot no tā paša barības avota, ko paredzēts lietot testēšanā. Tārpi jātur testēšanas temperatūrā, proti, 20 ± 2 °C. Pēc reģenerācijas testēšanā izmanto neskartus un veselus tārpus, kas pēc vieglas mehāniskas stimulēšanas aktīvi peld vai rāpo. Jānovērš tārpu savainošana vai autohtomija, piemēram, darbā ar tārpiem jāizmanto pipetes ar rūdītām malām vai nerūsošā tērauda irbulīši.

Lumbriculus variegatus **sākumkultūru avoti (adreses ASV aizgūtas no (4))**

Eiropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Vācija

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Vācija

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Somija

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Vācija

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

ASV

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 University 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

ATSAUCES

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) Kukkonen, J. and 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. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & 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. & 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., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) 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.

▼M6

6. papildinājums

Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātu kopsavilkums

"Sedimentu toksicitātes tests ar *Lumbriculus variegatus*"

1. tabula.

Atsevišķo starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas mēģinājumu rezultāti. Vidējais tārpu skaits kontrolgrupas un šķīdinātāju kontrolgrupas paraugos testēšanas beigās; *SD* = standartnovirze; *CV* = variācijas koeficients.

	Vidējais tārpu skaits kontrolgrupas paraugos	SD	*CV* (%)	n	Vidējais tārpu skaits šķīdinātāju kontrolgrupas paraugos	SD	*CV* (%)	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
Starplaboratoriju vidējais	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
N	**15**				**15**			
min.	**16,3**				**15,0**			
maks.	**42,0**				**43,7**			
***CV* (%)**	**28,1**				**24,7**			

▼**M6**

2. tabula.

Atsevišķo starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas mēģinājumu rezultāti. Vidējais tārpu saussvars uz replikātu kontrolgrupas un šķīdinātāju kontrolgrupas paraugos testēšanas beigās; *SD* = standartnovirze; *CV* = variācijas koeficients.

	Kopējais tārpu saussvars uz replikātu (kontrolgrupās)	SD	*CV* (%)	n	Kopējais tārpu saussvars uz replikātu (šķīdinātāju kontrolgrupās)	SD	*CV* (%)	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
Starplaboratoriju vidējais	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
N	**15**				**15**			
min.	**12,9**				**10,5**			
maks.	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

3. tabula.

PHF toksicitāte. Kopsavilkums par beigupunktiem starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā; laboratoriju vidējās EC_{50}, *NOEC* un *LOEC* vērtības; *SD* = standartnovirze; *CV* = variācijas koeficients

Bioloģiskais parametrs		Starplaboratoriju vidējā vērtība (mg/kg)	min.	maks.	Starplaboratoriju koeficients	SD	*CV* (%)	Ģeometriskais vidējais (mg/kg)
Kopējais tārpu skaits	**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
	***MDD* (%)**	**22,5**	7,1	39,1				
Kopējais tārpu saussvars	**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
	***MDD* (%)**	**24,8**	10,9	44,7				
Mirstība/ izdzīvotība	**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
Vairošanās (tārpu skaita palielināšanās uz replikātu)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	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
	***MDD* (%)**	**29,7**	13,9	47,9				
Augšana (biomasas palielināšanās uz replikātu)	**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
	***MDD* (%)**	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: minimālā nosakāmā atšķirība no kontrolgrupas vērtībām hipotēzes pārbaudē laikā; izmanto par statistiskās jaudas rādītāju

ATSAUCE

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 German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. **PLĒSĒJĒRCES *(HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER)* VAIROŠANĀS TESTS AUGSNĒ**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 226 (2008). Šī testēšanas metode ir izveidota, lai izvērtētu augsnē esošu ķīmisko vielu ietekmi uz augsnes ērču sugas *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer Canestrini (Acari: Laelapidae)* vairošanās rādītāju, ļaujot aplēst specifiskā populācijas augšanas ātruma inhibēšanos (1, 2). Šajā gadījumā vairošanās rādītājs nozīmē jauno īpatņu skaitu testēšanas perioda beigās. *H. aculeifer* pārstāv vēl vienu trofisko līmeni papildus tām sugām, kam jau ir pieejamas testēšanas metodes. Šai testēšanas metodei par pieņemamu uzskatāms vairošanās tests bez dažādo reproduktīvā cikla stadiju izšķiršanas un kvantifikācijas. Ja eksponētība ķīmiskajām vielām nerodas ar augsnes starpniecību, var būt piemērotas citas pieejas (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* uzskata par reprezentatīvu augsnes faunas un konkrēti plēsējērču pārstāvi. Tā ir izplatīta visā pasaulē (5), un to ir viegli ievākt un izaudzēt laboratorijā. *H. aculeifer* bioloģiskās informācijas kopsavilkums ir sniegts 7. papildinājumā. Pamatinformācija par ērču sugu ekoloģiju un izmantošanu ekotoksikoloģiskajos pētījumos ir pieejama avotos (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

3. Pieaugušas mātītes noteiktā koncentrāciju diapazonā eksponē testējamai ķīmiskajai vielai, ko iejauc augsnē. Testēšanu sāk ar 10 pieaugušām mātītēm uz replikāttrauku. Tēviņus testēšanā neizmanto, jo pieredze liecina, ka mātītes pārojas uzreiz vai neilgi pēc izšķilšanās no deitonimfas stadijas, ja ir pieejami tēviņi. Turklāt tēviņu iekļaušana paildzinātu testēšanas ilgumu tādā mērā, ka kļūtu nepieciešams izšķirt dažādus vecumposmus. Līdz ar to pārošanās testā neietilpst. Mātītes iekļauj testā 28–35 dienas pēc olu dēšanas perioda sākuma sinhronizācijā (sk. 4. papildinājumu), jo tad var uzskatīt, ka mātītes ir jau pārojušās un izgājušas stadiju pirms olu dēšanas. 20 °C temperatūrā testēšana beidzas 14. dienā pēc mātīšu iekļaušanas (0. dienā), kas ļauj pirmajai pēcnācēju kontrolgrupai sasniegt deitonimfu stadiju (sk. 4. papildinājumu). Kā galveno mērīto mainīgo nosaka jauno īpatņu skaitu testēšanas traukos un papildus arī izdzīvojušo mātīšu skaitu. Testējamai ķīmiskajai vielai eksponēto ērču vairošanās rādītāju salīdzina ar to pašu rādītāju kontrolgrupās, lai noteiktu EC_x (piemēram, $EC_{10,}$ EC_{50}) vai nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (sk. definīcijas 1. papildinājumā) – atkarībā no eksperimenta plāna (sk. 29. punktu). Testēšanas grafika pārskats ir sniegts 8. papildinājumā.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

4. Vēlams zināt testējamās ķīmiskās vielas šķīdību ūdenī, log K_{ow}, augsnes/ūdens sadalīšanās koeficientu un tvaika spiedienu. Ir vēlama papildu informācija par testējamās ķīmiskās vielas apriti augsnē, piemēram, biotiskās un abiotiskās sadalīšanās ātrumu.

5. Šo testa metodi var izmantot ūdenī šķīstošām un nešķīstošām ķīmiskajām vielām. Tomēr attiecīgi atšķirsies arī testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas veids. Šī testēšanas metode nav izmantojama nedz gaistošām ķīmiskajām vielām, t. i., ķīmiskajām vielām, kurām Henrija konstante vai gaisa/ūdens sadalījuma koeficients ir lielāks nekā viens, nedz arī ķīmiskajām vielām, kuru tvaika spiediens pārsniedz 0,0133 Pa 25 °C temperatūrā.

▼M6

TESTA DERĪGUMS

6. Lai testa rezultāts būtu uzskatāms par derīgu, neapstrādātajās kontrolgrupās ir jābūt izpildītiem šādiem kritērijiem:

— testēšanas beigās vidējā pieaugušo mātīšu mirstība nedrīkst pārsniegt 20 %;

— testēšanas beigās vidējam jauno īpatņu skaitam uz replikātu (ja sākumā iekļautas 10 pieaugušas mātītes) vajadzētu būt vismaz 50;

— vidējā jauno ērču skaita uz replikātu variācijas koeficients galīgā testa beigās nedrīkst pārsniegt 30 %.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

7. Jānosaka ķīmiskās standartvielas *NOEC* un/vai EC_x, lai nodrošinātu to, ka laboratorijas testa apstākļi ir piemēroti, un lai pārliecinātos, ka testējamo organismu reakcija laika gaitā nemainījās. Piemērota ķīmiskā standartviela ar pierādītu ietekmi uz populācijas lielumu (4) ir dimetoāts (*CAS* Nr. 60-51-5). Par alternatīvu ķīmisko standartvielu var izmantot borskābi (*CAS* Nr.: 10043-35-3). Ar šo ķīmisko vielu ir mazāka pieredze. Ir iespējami divi plāna varianti.

— Ķīmisko standartvielu var testēt paralēli katras testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes noteikšanai vienā koncentrācijā, kas, kā iepriekš pierādīts devas–atbildreakcijas pētījumā, ietekmē pēcnācēju skaita samazināšanos par > 50 %. Šajā gadījumā replikātu skaitam vajadzētu būt tādam pašam kā kontrolgrupā (sk. 29. punktu).

— Alternatīvi ķīmisko standartvielu testē 1 – 2 reizes gadā devas–atbildreakcijas testā. Atkarībā no izraudzītā plāna koncentrāciju un replikātu skaits un kvocients, par kādu pieaug katra nākamā koncentrācija, atšķiras (sk. 29. punktu), taču būtu jāpanāk 10 – 90 % ietekme (kvocients – 1,8). Dimetoāta EC_{50}, pamatojoties uz jauno īpatņu skaitu, vajadzētu būt robežās no 3,0 līdz 7,0 mg/kg augsnes (saussvara). Pamatojoties uz līdz šim iegūtajiem rezultātiem ar borskābi, EC_{50}, kura pamatā ir jauno īpatņu skaits, vajadzētu būt robežās no 100 līdz 500 mg/kg augsnes saussvara.

TESTA APRAKSTS

Testēšanas trauki un aprīkojums

8. Būtu jāizmanto no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla testēšanas trauki 3 – 5 cm diametrā (augsnes līmenis ≥ 1,5 cm), ar ciešu, piegulošu vāku. Priekšroka dodama uzskrūvējamiem vākiem, un tādā gadījumā trauki jāvēdina divas reizes nedēļā. Alternatīvi var izmantot pārklājus, kas dara iespējamu tiešu gāzu apmaiņu starp substrātu un atmosfēru (piemēram, marle). Tā kā testēšanas laikā ir jāuztur pietiekami augsts mitruma līmenis, testēšanas laikā ir būtiski kontrolēt katra eksperimenta trauka svaru un, ja nepieciešams, atjaunināt ūdens saturu. Tas ir īpaši svarīgi, ja nav pieejami uzskrūvējami vāki. Ja izmanto necaurspīdīgu testēšanas trauku, vākam vajadzētu būt izgatavotam no materiāla, kas ļauj iekļūt gaismai (piemēram, perforētam, caurspīdīgam vākam), vienlaikus neļaujot ērcēm izkļūt no trauka. Testēšanas trauku izmērs un tips ir atkarīgs no ekstrakcijas metodes (sīkāku informāciju sk. 5. papildinājumā). Ja testēšanas traukus ekstrakcijai ar karstumu pakļauj tieši, var pievienot apakšas sietu ar piemērotu acu lielumu (noslēgtu līdz ekstrakcijai) un augsnes dziļumam vajadzētu būt pietiekamam, lai nodrošinātu temperatūras un mitruma gradientu.

▼M6

9. Nepieciešams laboratorijas standartaprīkojums, jo īpaši:

— vēlams – stikla trauki ar uzskrūvējamiem vākiem;

— žāvēšanas skapis;

— stereomikroskops;

— otas ērču pārnešanai;

— pH mērītājs un luksometrs;

— piemēroti, precīzi svari;

— piemērota temperatūras kontroles ierīce;

— piemērota gaisa mitruma kontroles ierīce (nav obligāta, ja ekspozīcijas traukiem ir vāki);

— inkubators vai neliela telpa ar regulējamu temperatūru;

— ekstrakcijas aprīkojums (sk. 5. papildinājumu) (13);

— augšā novietots gaismas panelis ar regulējamu gaismu;

— burkas ekstrahēto ērču ievākšanai.

Mākslīgās augsnes sagatavošana

10. Šim testam izmanto mākslīgo augsni. Mākslīgā augsne sastāv no šādām sastāvdaļām (visas vērtības norādītas sausmasai):

— 5 % sfagnu kūdras, gaisžāvētas un smalki samaltas (daļiņu izmērs 2 ± 1 mm ir pieņemams);

— 20 % kaolīna mālu (kaolinīta saturam vēlams būt virs 30 %);

— apmēram 74 % gaisžāvētu rūpniecisko smilšu (atkarībā no nepieciešamā $CaCO_3$ daudzuma), lielākoties smalku smilšu, kas vairāk nekā par 50 % sastāv no daļiņām ar izmēru 50 līdz 200 mikroni. Faktiskais smilšu daudzums ir atkarīgs no $CaCO_3$ daudzuma (sk. zemāk), kopā tām vajadzētu sastādīt 75 %;

— < 1,0 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$, pulverizēts, analītiskās tīrības pakāpes), lai iegūtu pH 6,0 ± 0,5; pievienojamā kalcija karbonāta daudzums galvenokārt atkarīgs no kūdras kvalitātes/sastāva (sk. 1. piezīmi).

1. piezīme. Nepieciešamais $CaCO_3$ daudzums būs atkarīgs no augsnes substrāta sastāvdaļām, un tas būtu jānosaka ar augsnes apakšparaugu pH mērījumiem tieši pirms testēšanas (14).

2. piezīme. Kūdras saturs mākslīgajā augsnē atšķiras no citās augsnes organismu testēšanas metodēs lietotā, kad vairumā gadījumu izmanto 10 % kūdras (piemēram, (15)). Tomēr saskaņā ar EPPO (16) tipiskā lauksaimniecības augsnē nav vairāk kā 5 % organisko vielu, un kūdras satura samazinājums atspoguļo samazināto iespējamību, ka notiks testējamās ķīmiskās vielas sorbcija organiskajā ogleklī dabiskā augsnē.

3. piezīme. Ja nepieciešams, piemēram, specifiskiem testēšanas nolūkiem, par testēšanas un/vai kultūras substrātu var izmantot arī dabiskas augsnes no nepiesārņotām vietām. Tomēr, ja izmanto dabisku augsni, tā būtu jāraksturo vismaz pēc izcelsmes (ievākšanas vietas), pH, tekstūras (daļiņu izmēra

▼M6

sadalījuma) un organisko vielu satura. Ja zināms, būtu jāiekļauj augsnes tips un nosaukums saskaņā ar augšņu klasifikāciju, un augsne nedrīkst būt kontaminēta. Ja testējamā ķīmiskā viela ir metāls vai metālorganisks savienojums, būtu jānosaka arī dabīgās augsnes katjonu apmaiņas kapacitāte (KAK). Īpaša vērība jāpievērš derīguma kritēriju izpildei, jo pamatinformācija par dabiskām augsnēm parasti ir pieejama reti.

11. Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi samaisa (piemēram, liela izmēra laboratorijas maisītājā). pH noteikšanā izmanto augsnes un 1 M kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma maisījumu attiecībā 1:5 (sk. (14) un 3. papildinājumu). Ja augsnes skābums pārsniedz vajadzīgo diapazonu (sk. 10. punktu), to var koriģēt, pievienojot atbilstošu daudzumu $CaCO_3$. Ja augsne ir pārāk sārmaina, to var koriģēt, pievienojot vairāk maisījuma, kas satur pirmās trīs 10. punktā minētās sastāvdaļas, bet izlaižot $CaCO_3$.

12. Mākslīgās augsnes maksimālo ūdensnoturspēju *(WHC)* nosaka saskaņā ar 2. papildinājumā aprakstītajām procedūrām. Divas līdz septiņas dienas pirms testa sākšanas sauso mākslīgo augsni iepriekš samitrina, pievienojot pietiekami daudz destilēta vai dejonizēta ūdens, lai iegūtu apmēram pusi galīgā ūdens satura, kas ir 40 līdz 60 % maksimālās ūdensnoturspējas. Mitruma saturs tiek pielāgots 40–60 % maksimālās *WHC*, pievienojot testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu un/vai destilētu vai dejonizētu ūdeni (sk. 16.–18. punktu). Augsnes mitruma saturu vajadzētu aptuveni pārbaudīt, maigi saspiežot augsni rokās; ja mitruma saturs ir pareizs, starp pirkstiem jāparādās sīkiem ūdens pilieniem.

13. Augsnes mitruma saturu nosaka testēšanas sākumā un beigās, to izžāvējot līdz konstantam svaram 105 °C temperatūrā saskaņā ar ISO 11465 (17), bet augsnes pH – saskaņā ar 3. papildinājumu vai ISO 10390 (14). Šie mērījumi jāveic papildu paraugos bez ērcēm – gan kontrolgrupas augsnes paraugā, gan katras testējamās koncentrācijas augsnes paraugā. Augsnes pH nedrīkst pielāgot, ja tiek testētas skābas vai bāziskas ķīmiskās vielas. Mitruma saturs jāmonitorē visu testēšanas laiku, traukus periodiski nosverot (sk. 20. un 24. punktu).

Testējamo dzīvnieku izvēle un sagatavošana

14. Šajā testā izmanto sugu *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (*Canestrini*, 1883) Testam ir vajadzīgas pieaugušas mātītes, kas iegūtas no sinhronizētas kohortas. Mātītes ievieto testa traukos apmēram 7–14 dienas pēc tam, kad tās ir sasniegušas pieaugušo stadiju, 28 – 35 dienas pēc tam, kad sākusies olu dēšana sinhronizācijā (sk. 3. punktu un 4. papildinājumu). Jāreģistrē ērču izcelsme vai piegādātājs un laboratorijas kultūras uzturēšana. Ja tiek uzturēta laboratorijas kultūra, vismaz reizi gadā ir ieteicams noteikt piederību pie sugas. Piederības noteikšanas lapa ir iekļauta 6. papildinājumā.

Testējamo koncentrāciju sagatavošana

15. Testējamo ķīmisko vielu iejauc augsnē. Organiskie šķīdinātāji, ko izmanto, lai veicinātu augsnes apstrādi ar testējamo ķīmisko vielu, būtu jāizvēlas, pamatojoties uz to zemo toksicitāti ērcēm, un testēšanas plānā jāiekļauj attiecīga šķīdinātāja kontrolgrupa (sk. 29. punktu).

Ūdenī šķīstoša testējamā ķīmiskā viela

16. Pagatavo testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu dejonizētā ūdenī daudzumā, kas ir pietiekams visiem vienas testējamās koncentrācijas replikātiem. Ieteicams izmantot atbilstošu ūdens daudzumu, lai panāktu nepieciešamo mitruma saturu, t. i., 40–60 % maksimālās ūdensnoturspējas (sk. 12. punktu). Katru testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu pirms iemaisīšanas testēšanas traukā rūpīgi sajauc ar vienu partiju iepriekš samitrinātas augsnes.

▼M6

Ūdenī nešķīstoša testējamā ķīmiskā viela

17. Ja ķīmiskā viela nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskajos šķīdinātājos, testējamo ķīmisko vielu var izšķīdināt mazākajā iespējamā piemērotas nesējvielas (piemēram, acetona) tilpumā. Būtu jāizmanto tikai gaistoši šķīdinātāji. Kad izmanto tādas nesējvielas, visiem testējamās koncentrācijas un kontrolgrupas paraugiem jāsatur vienāds minimālais nesējvielas daudzums. Nesējvielu iesmidzina vai iejauc nelielā daudzumā (piemēram, 10 g) smalku kvarca smilšu. Substrāta kopējais smilšu saturs jākoriģē atbilstoši šim daudzumam. Nesējvielu iztvaicē, vismaz vienu stundu turot trauku velkmes skapī. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstošu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu nepieciešamo mitruma saturu. Galīgo maisījumu ievieto testēšanas traukos. Ņemiet vērā, ka daži šķīdinātāji var būt ērcēm toksiski. Tāpēc ir ieteicams izmantot papildu ūdens kontrolgrupu bez nesējvielas, ja nav zināms, vai šķīdinātājs ir toksisks ērcēm. Ja ir adekvāti pierādīts, ka šķīdinātājam (lietotam paredzētajās koncentrācijās) nav nekādas ietekmes, var izslēgt ūdens kontrolgrupu.

Ūdenī un organiskajos šķīdinātājos mazšķīstoša testējamā ķīmiskā viela

18. Ja ķīmiskā viela vāji šķīst ūdenī un organiskajos šķīdinātājos, 2,5 g smalki samaltu kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku (piemēram, 10 g smalku kvarca smilšu četriem replikātiem) samaisa ar tādu testējamās ķīmiskās vielas daudzumu, lai tiektu iegūta vēlamā testējamā koncentrācija. Substrāta kopējais smilšu saturs būtu jākoriģē atbilstoši šim daudzumam. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstošu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu nepieciešamo mitruma saturu. Galīgo maisījumu sadala pa testēšanas traukiem. Procedūru atkārto katrai testējamajai koncentrācijai un sagatavo arī atbilstošus kontroles paraugus.

PROCEDŪRA

Testa grupas un kontrolgrupas

19. Katrā kontrolgrupas un apstrādes traukā ieteicamas desmit pieaugušas mātītes uz 20 g mākslīgās augsnes sausās masas. Testējamie organismi jāpievieno divu stundu laikā pēc galīgā testa substrāta sagatavošanas (t. i., pēc testējamās vielas ievadīšanas). Specifiskos gadījumos (piemēram, ja nogatavināšanu uzskata par nosakošu faktoru) laiku no galīgā testējamā substrāta sagatavošanas līdz ērču pievienošanai var pagarināt (sīkāku informāciju par šādu nogatavināšanu sk. avotā (18)). Tomēr šādos gadījumos ir jāsniedz zinātnisks pamatojums.

20. Pēc ērču pievienošanas augsnei ērces apgādā ar barību un mēra katra testējamā trauka sākotnējo svaru, ko izmantos par atsauces svaru augsnes mitruma satura monitorēšanai visā testēšanas laikā, kā aprakstīts 24. punktā. Tad testēšanas traukus aizver, kā aprakstīts 8. punktā, un ievieto testēšanas kamerā.

21. Katrai testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas metodei, kas aprakstīta 15. līdz 18. punktā, sagatavo piemērotus kontrolparaugus. Sagatavojot kontrolparaugus, ievēro attiecīgās aprakstītās procedūras, izņemot to, ka nepievieno testējamo ķīmisko vielu. Tas nozīmē, ka attiecīgos gadījumos organiskos šķīdinātājus, kvarca smiltis un citas nesējvielas kontrolgrupas paraugiem pievieno tādās pašās koncentrācijās/daudzumos kā apstrādes paraugos. Ja testējamās ķīmiskās vielas pievienošanai izmanto šķīdinātāju vai citu nesējvielu un nav zināms šķīdinātāja toksiskums, jāsagatavo un jānotestē arī papildu kontrolparaugs bez nesējvielas vai testējamās ķīmiskās vielas (sk. 17. punktu).

▼M6

Testēšanas apstākļi

22. Testēšanas temperatūrai jābūt 20 ± 2 °C. Temperatūra jāreģistrē vismaz reizi dienā un jākoriģē, ja nepieciešams. Testu veic kontrolētos gaismas un tumsas ciklos (vēlams 16 stundas gaismas un 8 stundas tumsas) pie 400 līdz 800 luksu apgaismojuma testēšanas trauku tuvumā. Salīdzināšanas apsvērumu dēļ šie apstākļi ir tādi paši kā citos augsnes ekotoksikoloģiskajos testos (piemēram, (15)).

23. Ja izmanto uzskrūvējamus vāku, jānodrošina gāzu apmaiņa, vēdinot testēšanas traukus vismaz divreiz nedēļā. Ja izmanto marles pārklājus, jāpievērš īpaša vērība augsnes mitruma satura uzturēšanai (sk. 8. un 24. punktu).

24. Augsnes substrāta ūdens saturu testēšanas traukos uztur visā testēšanas laikā, testēšanas traukus regulāri pārsverot un, ja nepieciešams, rehidrējot (piemēram, reizi nedēļā). Zudumus pēc vajadzības kompensē ar dejonizētu ūdeni. Testēšanas laikā mitruma saturam no sākotnējās vērtības nevajadzētu atšķirties par vairāk nekā 10 %.

Barošana

25. Ir pierādīts, ka piemērots barības avots ir *Tyrophagus putrescentiae* (*Schrank,* 1781). Piemērotas var būt arī mazas lēcastes (piemēram, jaunas *Folsomia candida, Willem,*1902) vai *Onychiurus fimatus* (19), (20), sīksliekas (piemēram, *Enchytraeus crypticus, Westheide & Graefe,* 1992) vai nematodes (piemēram, *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). Ir ieteicams barību pirms izmantošanas testā pārbaudīt. Barības tipam un daudzumam būtu jānodrošina pietiekams jauno īpatņu skaits, lai varētu izpildīt derīguma kritērijus (6. punkts). Izvēloties barības avotu, jāņem vērā testējamās vielas iedarbības veids (piemēram, akaricīds var būt toksisks arī pārtikas ērcēm, sk. 26. punktu).

26. Barība jānodrošina *ad libitum* (t. i., katru reizi nelielā apmērā (piemēram, lāpstiņas gals)). Šim nolūkam var izmantot arī mazjaudīgu atsūcēju, kā ieteikts lēcastu testā, vai smalku krāsas otu. Barošana testēšanas sākumā un divas līdz trīs reizes nedēļā parasti ir pietiekama. Ja izrādās, ka testējamā ķīmiskā viela ir toksiska barības avotam, būtu jāapsver biežāka barošana un/vai alternatīvs barības avots.

Testēšanas koncentrāciju izvēle

27. Attiecīgas testēšanas koncentrācijas izvēlē vajadzētu izmantot iepriekšējas zināšanas par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, piemēram, no diapazona noteikšanas testiem. Ja nepieciešams, veic diapazona noteikšanas testu ar piecām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām no 0,1 līdz 1 000 mg/kg sausās augsnes – ar vismaz vienu apstrādes replikātu un kontrolreplikātu. Diapazona noteikšanas testa ilgums ir 14 dienas, pēc kā tiek noteikta pieaugušo ērču mirstība un jauno īpatņu skaits. Koncentrāciju diapazonu galīgajā testā vēlams izvēlēties tā, ka tas aptver koncentrācijas, kas ietekmē jauno īpatņu skaitu, bet ne mātīšu paaudzes izdzīvotību. Tas tomēr var nebūt iespējams tādu ķīmisko vielu gadījumā, kas izraisa letālu un subletālu ietekmi gandrīz vienādās koncentrācijās. Testā iekļautajām koncentrācijām būtu jāatver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) un koncentrāciju diapazons, kurā tiek pētīta testējamās ķīmiskās vielas ietekme. Datu ekstrapolēšana ievērojami zem mazākās koncentrācijas, kas ietekmē testējamos organismus, vai virs augstākās testētās koncentrācijas jāveic tikai izņēmuma gadījumos, un pārskatā jāiekļauj pilnīgs paskaidrojums.

Eksperimentālais plāns

Devas–atbildreakcijas testi

28. Pamatojoties uz vēl vienas starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas (sīkslieku

▼M6

vairošanās testa (22)) rekomendācijām, tiek piedāvāti trīs testa plāni. Visu šo plānu vispārējā piemērotību apstiprināja *H. aculeifer* validācijas iznākums.

29. Nosakot koncentrāciju diapazonu, būtu jāpatur prātā turpmākais.

— EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{50}) noteikšanai būtu jātestē divpadsmit koncentrācijas. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami vismaz divi replikāti, kā arī vēl seši kontrolreplikāti. Kvocients var atšķirties, t. i., tas var būt mazāks vai vienāds ar 1,8 paredzamajā ietekmes diapazonā un lielāks nekā 1,8 augstākām vai zemākām koncentrācijām.

— *NOEC* noteikšanai būtu jāizmanto vismaz piecas koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai testējamajai koncentrācijai ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 2,0 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

— Kombinēta pieeja ļauj noteikt gan *NOEC*, gan EC_x. Būtu jāizmanto astoņas apstrādes koncentrācijas ģeometriskā progresijā. Katrai apstrādei ieteicami četri replikāti, kā arī vēl astoņi kontrolreplikāti. Katrai nākamajai koncentrācijai būtu jābūt ne vairāk kā 1,8 reizes lielākai nekā iepriekšējai.

Robežtests

30. Ja diapazona noteikšanas testā pie augstākās koncentrācijas (t. i., 1 000 mg/kg augsnes sausmasas) nenovēro nekādu ietekmi, galīgo vairošanās testu var veikt kā robežtestu, izmantojot 1 000 mg/kg augsnes sausmasas. Robežtests sniegs iespēju pierādīt, ka vairošanās *NOEC* vai EC_{10} ir lielāka nekā robežkoncentrācija, vienlaikus samazinot testā izmantojamo ērču skaitu līdz minimumam. Gan apstrādātajai augsnei, gan kontrolgrupai vajadzīgi astoņi replikāti.

Testēšanas ilgums un mērījumi

31. Jebkādas novērotās atšķirības ērču uzvedībā un morfoloģijā starp kontrolgrupas un apstrādes traukiem būtu jāreģistrē.

32. 14. dienā izdzīvojušās ērces ekstrahē no augsnes ar karstuma/gaismas ekstrakciju vai citu piemērotu metodi (sk. 5. papildinājumu). Atsevišķi saskaita jaunos īpatņus (t. i., kāpurus, protonimfas un deitonimfas) un pieaugušos īpatņus. Visas pieaugušās ērces, kas šajā laikā netiek atrastas, ir reģistrējamas kā mirušas, jo tiek pieņemts, ka šādas ērces ir mirušas un sadalījušās pirms novērtēšanas. Ekstrakcijas efektivitāte vienreiz vai divreiz gadā jāvalidē kontrolgrupas paraugos ar zināmu pieaugušo un jauno īpatņu skaitu. Efektivitātei vajadzētu būt vidēji virs 90 % visām attīstības stadijām kopā (sk. 5. papildinājumu). Pieaugušo un jauno īpatņu skaitu nekoriģē atbilstoši efektivitātei.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

33. Informācija par statistiskajām metodēm, ko var izmantot testēšanas rezultātu analīzē, ir sniegta 36. līdz 41. punktā. Papildus būtu jāizmanto ESAO 54. dokuments "Pašreizējās pieejas ekotoksicitātes datu statistiskajai analīzei: lietošanas norādījumi" (31).

34. Testa galvenais beigupunkts ir vairošanās iznākums – šajā gadījumā izšķīlušos jauno īpatņu skaits uz replikāttrauku (ar 10 sākumā ievietotajām mātītēm). Statistiskajai analīzei nepieciešams vairošanās rādītāja aritmētiskais vidējais (X) un dispersija (s^2), lai aprēķinātu iznākumu apstrādes un

▼M6

kontrolgrupas paraugos. X un s^2 izmanto *ANOVA* procedūrās, piemēram, Stjūdenta t-testā, Daneta testā vai Viljamsa testā, kā arī 95 % ticamības intervālu noskaidrošanai.

Piezīme. Šis galvenais beigupunkts ir līdzvērtīgs auglībai, ko mēra kā dzīvo jauno īpatņu skaitu, kas izšķīlušies testēšanas laikā, dalītu ar testa sākumā ievietoto mātīšu skaitu.

35. Izdzīvojušo mātīšu skaits neapstrādātajos kontrolgrupas paraugos ir svarīgs derīguma kritērijs, un tas ir jādokumentē. Tāpat kā diapazona noteikšanas testā, galīgajā pārskatā ir jāiekļauj arī visas citas kaitējuma pazīmes.

EC_x

36. EC_x vērtības, tostarp tās, kas saistītas ar zemāko un augstāko 95 % ticamības robežvērtību parametriem, kas aprakstīti 34. punktā, aprēķina, izmantojot atbilstošas statistiskās metodes (piemēram, probita analīzi, logistisko vai Veibula funkciju, saīsināto Spīrmena–Kerbera metodi vai vienkāršu interpolāciju). EC_x iegūst, iegūtajā vienādojumā ievietojot vērtību, kas atbilst x % kontrolgrupas vidējās vērtības. Lai aprēķinātu EC_{50} vai jebkādu citu EC_x, pirms apstrādes vidējā vērtība (X) būtu jāpakļauj regresijas analīzei.

NOEC/LOEC

37. Ja statistiskā analīze ir paredzēta *NOEC/LOEC* noteikšanai, ir nepieciešama statistika par katru trauku (atsevišķos traukus uzskata par replikātiem). Būtu jāizmanto piemērotas statistiskās metodes (saskaņā ar ESAO 54. dokumentu *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*). Testējamās vielas nelabvēlīgo ietekmi salīdzinājumā ar kontrolgrupu pētī, izmantojot vienpusēju (mazāku) hipotēzes pārbaudi pie $p \leq 0,05$. Piemēri ir sniegti turpmākajos punktos.

38. Datu normālsadalījumu var pārbaudīt, piemēram, ar Kolmogorova–Smirnova atbilstības testu, diapazona un standartnovirzes attiecības testu (R/s testu) vai Šapiro–Vilka testu (divpusēju, $p \leq 0,05$). Dispersijas homogenitāti var pārbaudīt Kohreina testu, Levena testu vai Bartleta testu (divpusēju, $p \leq 0,05$). Ja parametriskās testēšanas procedūras priekšnosacījumi (normalitāte, dispersijas homogenitāte) ir izpildīti, var veikt vienpusēju dispersijas analīzi *(ANOVA)* un turpmākus daudzpusējas salīdzināšanas testus. Daudzpusējos salīdzinājumus (piemēram, Daneta testu) vai descendentus trenda testus (piemēram, Viljamsa testu monotonas devas un atbildreakcijas sakarības gadījumā) var izmantot, lai aprēķinātu, vai pastāv būtiskas atšķirības ($\leq 0,05$) starp kontrolēm un dažādām testējamās vielas koncentrācijām (ieteicamā testa izvēle atbilstoši ESAO 54. dokumentam *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). Citos gadījumos *NOEC* un *LOEC* noteikšanai jāizmanto neparametriskās metodes (piemēram, Bonferoni U-tests pēc Holma vai Džonkhīra–Terpstras trenda tests).

Robežtests

39. Ja ir veikts robežtests (kontrolgrupas un tikai vienas apstrādes salīdzinājums) un ir izpildīti parametrisko testēšanas procedūru priekšnosacījumi (normalitāte, homogenitāte), metriskās atbildreakcijas var izvērtēt ar Stjūdenta testu (t-testa). Ja šie priekšnosacījumi nav izpildīti, var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testu (Velča t-testu) vai neparametrisku testu, piemēram, Manna–Vitnija U-testu.

40. Lai noteiktu būtiskas atšķirības starp kontrolgrupām (kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu), katras kontrolgrupas replikātus var testēt, kā aprakstīts

▼M6

attiecībā uz robežtestu. Ja šajos testos netiek atklātas būtiskas atšķirības, visus kontrolgrupas un šķīdinātāja kontrolgrupas replikātus var apkopot. Citādi visas apstrādes grupas jāsalīdzina ar šķīdinātāja kontrolgrupu.

Testēšanas pārskats

41. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija.

— *Testējamā ķīmiskā viela:*

— testējamās ķīmiskās vielas identitāte, nosaukums, partija, sērija, *CAS* numurs un tīrība;

— testējamās ķīmiskās vielas īpašības (piemēram, log K_{ow}, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, Henrija konstante (H) un – vēlams – informācija par tās apriti augsnē).

— *Testa organismi:*

— testa organismu identifikācija un piegādātājs, kultivēšanas apstākļu apraksts;

— testa organismu vecuma diapazons.

— *Testēšanas apstākļi:*

— eksperimenta plāna un procedūras apraksts;

— testējamās augsnes sagatavošanas apraksts; sīka specifikācija, ja izmanto dabisku augsni (izcelsme, vēsture, daļiņu izmēra sadalījums, pH, organisko vielu saturs un augsnes klasifikācija, ja zināma);

— augsnes maksimālā ūdensnoturspēja;

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai augsnē izmantotā paņēmiena apraksts;

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmantoto ķīmisko palīgvielu apraksts;

— testēšanas trauku lielums un testējamās augsnes sausmasa uz trauku;

— testēšanas apstākļi: gaismas intensitāte, gaismas un tumsas ciklu ilgums, temperatūra;

— barošanas režīma apraksts; testā izmantotās barības veids un daudzums; barošanas datumi;

— augsnes pH un ūdens saturs testēšanas sākumā un laikā (kontrolgrupā un katrā apstrādes grupā);

— sīks ekstrakcijas metodes un ekstrakcijas efektivitātes apraksts.

— *Testa rezultāti:*

— katrā testēšanas traukā noteikto jauno īpatņu skaits testēšanas beigās;

— pieaugušo mātīšu skaits un pieaugušo mirstība (%) katrā testēšanas traukā testēšanas beigās;

— acīmredzamu simptomu vai uzkrītošu uzvedības izmaiņu apraksts;

— rezultāti, kas iegūti ar ķīmisko standartvielu;

— statistikas (EC_x un/vai *NOEC*) kopsavilkums, tostarp 95 % ticamības robežas un aprēķina metodes apraksts;

▼**M6**

— koncentrācijas un atbildreakcijas sakarības grafisks attēlojums;

— atkāpes no procedūrām, kas aprakstītas šajā testēšanas metodē, un jebkādi neraksturīgi notikumi testēšanas laikā.

LITERATŪRA

(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. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and 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. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of Hypoaspis aculeifer (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 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: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite Hypoaspis aculeifer preying on the collembolan Folsomia fimetaria. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. Eds. SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (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. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 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, 95-122.

(14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

(15) Šā pielikuma C.8 nodaļa "Toksicitāte sliekām".

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and 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). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Šā pielikuma C.32. nodaļa "Sīkslieku vairošanās tests".

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and 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. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 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). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and 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 (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

▼M6

1. papildinājums

Definīcijas

Šai testēšanas metodei ir piemērojamas šādas definīcijas (visas ietekmes koncentrācijas šajā testā tiek izteiktas kā testējamās ķīmiskās vielas masas un testa augsnes sausmasas attiecība).

Ķīmiskā viela ir viela vai vielu maisījums.

NOEC (nenovērojamās ietekmes koncentrācija) ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kādā ietekme nav novērojama. Šajā testā *NOEC* atbilstošajai koncentrācijai attiecīgajā ekspozīcijas periodā nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$) salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

LOEC (zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija) ir zemākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kādā attiecīgajā ekspozīcijas periodā ir statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$) salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

ECx (ietekmes koncentrācija, kas atbilst x % ietekmei) ir koncentrācija, kas attiecīgajā ekspozīcijas periodā testa organismos rada x % ietekmi salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Piemēram, EC_{50} ir aplēstā koncentrācija, kurai eksponētajā populācijā noteiktā ekspozīcijas periodā ir 50 % ietekme uz kādu testa beigupunktu.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai vielu maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Augsnes maksimālās ūdensnoturspējas noteikšana

Uzskata, ka augsnes maksimālās ūdensnoturspējas noteikšanai piemērota ir šāda metode. Tā ir aprakstīta ISO DIS 11268-2 ("Augsnes kvalitāte – Piesārņotāju ietekme uz sliekām *(Eissenia fetida)* 2. daļa: Ietekme uz reprodukciju" C pielikumā. (23)).

Ar piemērotu parauga ņemšanas ierīci (gliemežcauruli u. tml.) ievāciet noteiktu daudzumu (piemēram, 5 g) testēšanas augsnes substrāta. Caurules apakšu pārklājiet ar filtrpapīra gabalu, caurulē iepildiet ūdeni un to novietojiet uz statīva ūdens peldē. Cauruli pakāpeniski iegremdē, līdz ūdens līmenis pārsniedz augsnes virsas līmeni. Ūdenī to atstāj apmēram trīs stundas. Tā kā augsne nevar paturēt visu ūdeni, kas iesūcies kapilāros, augsnes paraugs divas stundas jāpažāvē, cauruli segtā traukā (lai novērstu izkalšanu) novietojot uz ļoti mitru smalku kvarca smilšu pamatnes. Tad paraugs jānosver, 105 °C to izžāvējot līdz konstantai masai. Ūdensnoturspēju *(WHC)* var aprēķināt šādi:

$$WHC\ (\%\ \text{sausmasas}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kur:

S = ūdens piesātinātais substrāts + caurules masa + filtrpapīra masa

T = tara (caurules masa + filtrpapīra masa)

D = substrāta sausmasa

▼**M6**

3. papildinājums

Augsnes PH noteikšana

Turpmākā augsnes pH noteikšanas metode balstās uz aprakstu ISO DIS 10390. Augsnes kvalitāte – pH noteikšana (16).

Noteiktu augsnes daudzumu vismaz 12 h žāvē istabas temperatūrā. Tad ar 1 M analītiskās tīrības pakāpes kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M analītiskās tīrības pakāpes kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīdumu pagatavo augsnes suspensiju (ar vismaz 5 gramiem augsnes), kas vismaz piecas reizes pārsniedz augsnes tilpumu. Suspensiju piecas minūtes labi sakrata un vismaz divas stundas, bet ne ilgāk kā 24 stundas ļauj nosēsties. Tad ar pH mērītāju, kas pirms katra mērījuma kalibrēts, izmantojot attiecīgu buferšķīdumu sēriju (piemēram, pH 4,0 un 7,0), izmēra šķidrās fāzes pH.

▼M6

4. papildinājums

Pārtikas ērču *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* audzēšana un kultūras sinhronizācija

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* audzēšana**

Kultūras var turēt plastmasas traukos vai stikla burkās, kas pildītas ar ģipša un kokogļu pulvera maisījumu (attiecībā 9:1). Ja nepieciešam, ģipsi var uzturēt mitru, pievienojot dažus pilienus destilēta vai dejonizēta ūdens. Optimālā audzēšanas temperatūra ir 20 ± 2 °C, gaismas/ tumsas režīms šīm sugām nav būtisks. Barības avots var būt *Typrophagus putrescentiae* vai *Caloglyphus* sugu ērces (ar pārtikas ērcēm jāstrādā uzmanīgi, jo cilvēkiem tās var radīt alerģijas), bet piemērots barības avots var būt arī nematodes, sīksliekas un lēcastes. To izcelsme jāreģistrē. Populācijas augšana var sākties ar vienu mātīti, jo tēviņi attīstās no neapaugļotām oliņām. Paaudzes plaši pārklājas. Mātīte var nodzīvot vismaz 100 dienas un dzīves laikā var izdēt apmēram 100 oliņas. Maksimālā dēšanas intensitāte tiek sasniegta 10. līdz 40. dienā (pēc pieaugušās stadijas sasniegšanas) un atbilst 2,2 oliņām uz mātīti dienā. 20 °C temperatūrā attīstība no oliņas līdz pieaugušai mātītei notiek apmēram 20 dienas. Būtu iepriekš jāuztur un jāpatur vairāk nekā viena kultūra.

***Typrophagus putrescentiae* audzēšana**

Ērces glabā ar smalku alus rauga pulveri pildītā stikla traukā, ko ievieto plastmasas spainī, kurš piepildīts ar KNO_3 šķīdumu, lai neļautu tām izbēgt. Pārtikas ērces novieto uz šā pulvera. Pēc tam tās ar lāpstiņu uzmanīgi iejauc pulverī (kas jānomaina divas reizes nedēļā).

Kultūras sinhronizācija

Īpatņiem, ko izmanto testēšanā, jābūt vienāda vecuma (apmēram 7 dienas pēc pieaugušo stadijas sasniegšanas). Audzēšanas temperatūrā 20 °C to panāk šādi.

Mātītes pārvieto uz tīru audzēšanas trauku un tajā ieliek pietiekami daudz barības.

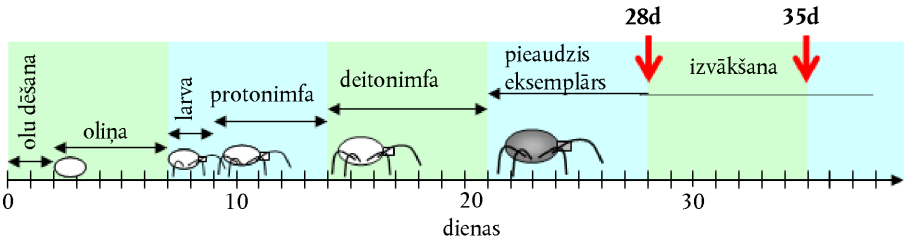
— Ļauj divas līdz trīs dienas notikt dēšanai, pēc tam mātītes izvāc.

— 28. līdz 35. dienā no sākuma testēšanai paņem pieaugušās mātītes, tās ievietojot tīros audzēšanas traukos.

Pieaugušās mātītes pēc to lielākā izmēra, uzpūstās formas un brūnā muguras vairoga viegli atšķirt no tēviņiem (tēviņi ir slaidāki un plakani) un citām attīstības stadijām (nenobriedušie īpatņi ir balti līdz krēmkrāsas). Ērču attīstība notiek apmēram pēc turpmāk aprakstītās shēmas temperatūrā, kas zemāka nekā 20 °C (attēls): oliņa – 5 d., kāpurs – 2 d., protonimfa – 5 d., deitonimfa – 7 d., mātītēm pirmsdēšanas periods – 2 d. Pēc tam ērces ir pieaugušas.

Diagramma

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* attīstība 20 °C temperatūrā (izvākšana = mātītes, ko izmanto testēšanā).**



▼**M6**

28. līdz 35. dienā pēc tam, kad jauno ērču mātes sākušas dēt (t. i., 7.–14. dienā, kopš jaunās ērces pieaugušas), pieaugušos testa dzīvniekus no sinhronizētās kultūras izvāc un ievieto testēšanas traukos. Tas nodrošina, ka testa dzīvniekiem pirmsdēšanas periods jau bijis un tie ir pārojušies ar kultivēšanas traukā esošajiem tēviņiem. Laboratorijas kultūru novērojumi liecina, ka tēviņu klātbūtnē mātītes pārojas uzreiz pēc pieaugšanas vai neilgi pēc tās (*Ruf, Vanninen,* personīgie novērojumi). Septiņu dienu periods ir izraudzīts, lai veicinātu integrēšanos laboratorijas režīmā un izlīdzinātu ērču individuālās attīstības atšķirības. Dēšanas sākumā mātīšu skaitam vajadzētu būt vismaz tikpat lielam, kāds beigās būs vajadzīgs testēšanai (ja, piemēram, testēšanai ir vajadzīgas 400 mātītes, vismaz 400 mātītēm jāļauj dēt divas līdz trīs dienas). Sinhronizētās populācijas sākumpunktam vajadzīgas vismaz 1 200 oliņas (dzimumu attiecība apmēram 0,5, mirstība apmēram 0,2). Lai nenotiktu kanibālisms, vienā testēšanas traukā, ja iespējams, turiet ne vairāk kā 20–30 dējošas mātītes.

▼M6

5. papildinājums

Ekstrakcijas metodes

Mikroposmkājiem piemērota metode īpatņu atdalīšanai no augsnes/substrāta ir karstumekstrakcija (skatīt attēlu zemāk). Metodes pamatā ir organismu aktivitāte, tāpēc atzīmēti var tikt tikai kustīgie īpatņi. Karstumekstrakcijas princips ir organismu apstākļus paraugā pakāpeniski pasliktināt, liekot tiem substrātu pamest un iekrist fiksācijas šķidrumā (piemēram, etanolā). Būtisks ir ekstrakcijas ilgums un organismu apstākļu gradients no labiem līdz mēreniem, līdz sliktiem. Ekotoksikoloģiskajā testēšanā ekstrakcija jāveic iespējami ātri, jo jebkāda populācijas augšana ekstrakcijas laikā sagrozītu rezultātus. No otras puses, temperatūras un mitruma apstākļiem paraugā vienmēr jābūt tādās robežās, ka ērces var pārvietoties. Augsnes parauga karsēšana noved pie substrāta izžūšanas. Ja izžūšana notiek pārāk strauji, dažas ērces arī var izžūt, pirms tās paspēj izbēgt.

Tāpēc ir ieteicama šāda procedūra (24) (25).

Aprīkojums: Tulgrena piltuve vai ar to salīdzināmas metodes, piemēram, Makfadjena metode (paraugs tiek novietots virs piltuves, karsējot no augšas).

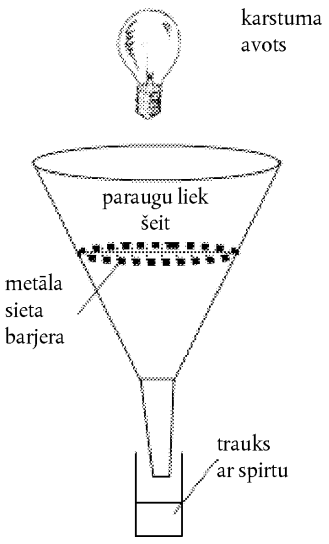
Karsēšanas režīms: 25 °C 12 h, 35 °C 12 h, 45 °C 24 stundas (kopā 48 h). Substrātā jāmēra temperatūra.

Fiksācijas šķīdums: 70 % etanols.

Detalizēta informācija: ņem testēšanā izmantoto stikla trauku. Noņem vāciņu un ap atveri aptin marles vai auduma gabalu. Audumam jābūt ar 1,0 līdz 1,5 mm acīm. Audumu nostiprina ar elastīgu gumiju. Stikla trauku uzmanīgi apgriež otrādi un ievieto ekstrakcijas aparātā. Audums neļauj substrātam iepilēt fiksācijas šķīdumā, taču ļauj ērcēm atstāt paraugu. Kad visi trauki ievietoti, sāk karsēšanas režīmu. Pēc 48 stundām ekstrakciju beidz. Traukus ar fiksācijas šķidrumu noņem un ar stereoskopisko mikroskopu saskaita ērces.

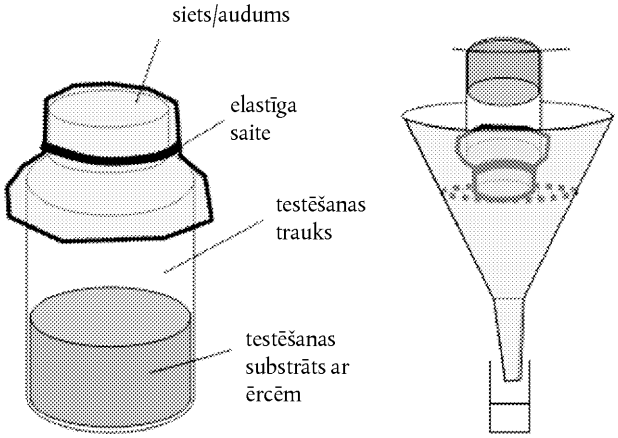
Vienreiz vai divreiz gadā jāpierāda izraudzītās metodes ekstrakcijas efektivitāte, izmantojot traukus, kuros ir zināms skaits neapstrādātā testējamā substrātā turētu jauno un pieaugušo ērču. Pa visām attīstības stadijām kopā efektivitātei vajadzētu būt vidēji ≥ 90 %.

Tulgrena tipa ekstrakcijas ierīce



▼**M6**

Kā testēšanas trauku pēc testa pabeigšanas sagatavot ekstrakcijai



▼**M6**

6. papildinājums

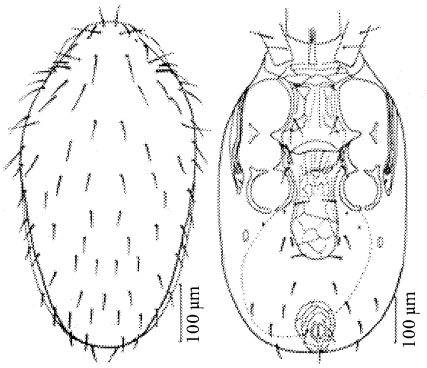
***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* piederība**

Apakšklase/kārta/apakškārta:	Dzimta:	Ģints/ apakšģints/sugas:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae.	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

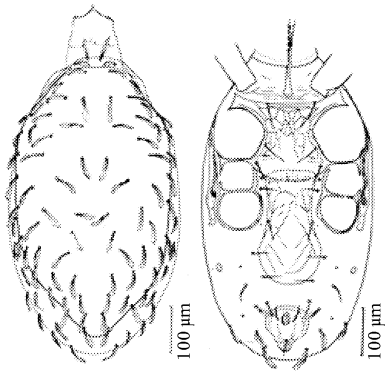
Autors un datums:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007

Izmantotā literatūra:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. *Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food* 9:*400pp.* Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

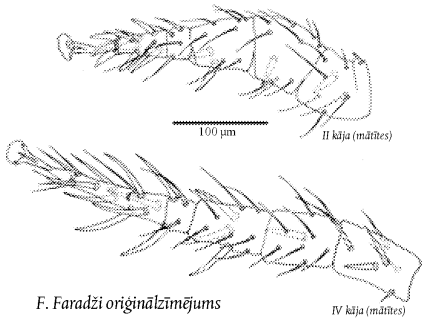
Raksturīgās pazīmes:	tektums *(tectum)* ar noapaļotu, zobainu malu; hipostomas rievas ar vairāk nekā sešiem zobiņiem; kaudāli dorsāli Z4 sari, ne īpaši gari; akotveidīgi dorsālie sari; ģenitālais vairogs normāls, ne īpaši liels un neaizsniedz anālo vairogu; dorsālā vairoga pakaļējā puse bez nepāra sariem; II un IV kājas ar dažiem bieziem makrosariem; dorsālais Z5 sars divas reizes garāks nekā J5; fiksēts heliceru skaits ar 12–14 zobiem un kustīga helicera ar diviem zobiem; 520–685 μm gara idiosoma. *Hypoaspis miles* izmanto arī bioloģiskajā kontrolē, un tās var sajaukt ar *H. aculeifer*. Galvenā atšķirība: *H. miles* pieder *Cosmolaelaps* apakšģintij un tai ir nažveidīgi dorsālie sari, turpretī *H. aculeifer* pieder *Geolaelaps* apakšģintij, un tai ir akotveidīgi dorsālie sari.



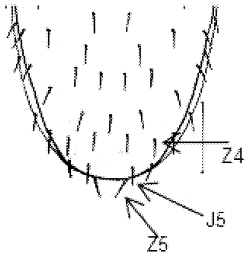
Hypoaspis aculeifer pēc Hjūza, 1976



Hypoaspis miles pēc Hjūza, 1976



F. Faradži oriģinālzīmējums



Hypoaspis aculeifer,
dorsālais vairogs ar raksturīgiem sariem

▼M6

7. papildinājums

Pamatinformācija par Hypoaspis (GEolaelaps) aculeifer bioloģiju

Hypoaspis aculeifer pieder pie *Arthropoda* tipa *Arachnida* klases *Acari* (ērču) kārtas *Laelapidae* dzimtas. Tās dzīvo visu veidu augsnēs un pārtiek no citām ērcēm, nematodēm, sīksliekām un lēcastēm (26). Barības trūkuma gadījumā tās pievēršas kanibālismam (27). Plēsējērces ķermenī ir idiosoma un gnatosoma. Idiosoma nav skaidri diferencēta prosomā (galvā) un opistosomā (vēderā). Gnatosomā (galvas vairogā) atrodas barošanās orgāni, piemēram, pedipalpas un heliceras. Heliceras ir trīszarainas un tām ir dažādas formas zobi. Papildus barības norīšanai tēviņi savas heliceras izmanto galvenokārt tam, lai mātītēs nogādātu spermatoforus. Idiosomu gandrīz pilnīgi nosedz dorsāls vairogs. Lielu daļu mātīšu idiosomas aizņem reproduktīvie orgāni, kas kļūst īpaši pamanāmi neilgi pirms oliņu dēšanas. Ventrāli var atrast divus vairogus – sternālo un ģenitālo. Visas kājas ir klātas ar sariņiem un āķīšiem. Sariņus izmanto, lai pieķertos, pārvietojoties augsnē vai pa to. Pirmo kāju pāri pārsvarā izmanto par antenām. Otro kāju pāri izmanto ne tikai, lai pārvietotos, bet arī, lai satvertu laupījumu. Ceturtā kāju pāra āķīšus var izmantot ne vien aizsardzībai, bet arī par "kustīgu motoru" (28). Tēviņi ir 0,55–0,65 mm gari un sver 10–15 μg. Mātītes ir 0,8–0,9 mm garas un sver 50–60 μg (8) (28) (1. att.).

1. att.

Mātīte, tēviņš, protonimfa un *H. aculeifer* kāpuri.



23 °C temperatūrā ērces dzimumgatavību sasniedz attiecīgi pēc 16 dienām (mātītes) un 18 dienām (tēviņi) (6). Mātītes spermu pārnes ar solenostomu, no kurienes tā nonāk ovārā. Ovārā sperma nobriest un tiek uzglabāta. Tikai pēc spermas nobriešanas ovārā notiek apaugļošanās. Mātītes dēj apaugļotas vai neapaugļotas oliņas pikās vai pa vienai, dodot priekšroku plaisām vai caurumiem. Kopojušās mātītes var izdēt oliņas, no kurām izšķiļas abu dzimumu jaunie īpatņi, turpretī no nekopojušos mātīšu oliņām izšķiļas tikai vīrišķā dzimuma jaunie īpatņi. Līdz brieduma sasniegšanai tiek izietas četras attīstības fāzes (oliņa – kāpurs, kāpurs – protonimfa, protonimfa – deitonimfa, deitonimfa – pieaudzis indivīds).

Oliņa ir pienbalta, stiklaina, eliptiska un apmēram 0,37 mm gara, ar cietu apvalku. Saskaņā ar avotu (8) kāpuri ir 0,42–0,45 mm gari. Tiem ir tikai trīs kāju pāri. Galvas reģionā ir attīstījušies taustekļi un heliceras. Heliceras, kam ir daži sīki zobiņi, izmanto, lai izšķiltos no oliņām. Pēc pirmās ādas mešanas, 1–2 dienas pēc izšķilšanās attīstās protonimfas. Arī tās ir baltas, 0,45–0,62 mm (8) garas un tām ir četri kāju pāri. Zobi uz helicerām ir pilnībā attīstījušies. Sākot ar šo stadiju, ērces sāk meklēt barību. Šim nolūkam tās ar helicerām pārdur laupījuma kutikulu un tajā ievada sekrētu ekstraintestinālai sagremošanai. Izveidojušos

▼**M6**

barības putru ērce tad var izsūkt. Heliceras var izmantot arī, lai no barības objektiem izrautu lielākas daļiņas (28). Pēc vēl vienas ādas mešanas attīstās deitonimfas. Tās ir 0,60–0,80 mm (8) garas un dzeltenā līdz gaiši brūnā krāsā. Sākot ar šo fāzi, tās var diferencēties mātītēs un tēviņos. Pēc vēl vienas ekdīzes, kuras laikā dzīvnieki ir nekustīgi un tiem attīstās brūns vairogs (apm. pēc 14 dienām), ērces ir pieaugušas (28)(29)(30).To mūžs ir no 48 līdz 100 dienām 25 °C temperatūrā (27).

▼**M6**

8. papildinājums

***Hypoaspis* testa galveno darbību kopsavilkums un grafiks**

Laiks (dienās) testa sākums = 0. diena	Darbība/uzdevums
– 35. līdz – 28. diena	Mātītes no izejkultūras pārvieto tīros traukos, lai sāktu sinhronizāciju Divas dienas vēlāk: mātītes izvāc Divas vai trīs reizes nedēļā: dod pietiekami daudz barības
– 5. diena (+/- 2)	Pagatavo mākslīgo augsni
– 4. diena (+/- 2)	Nosaka mākslīgās augsnes WHC Naktī augsni atstāj žūt Nākamajā dienā: paraugus nosver un aprēķina WHC
– 4. diena (+/- 2)	Mākslīgo augsni iepriekš samitrina, lai panāktu WHC 20–30 %
0. diena	Sāk testēšanu: mākslīgajai augsnei pievieno testējamo ķīmisko vielu Katrā replikātā ievieto 10 mātītes Katru replikātu nosver Sagatavo abiotiskus kontrolparaugus mitruma satura un pH noteikšanai, divi replikāti uz katru apstrādes koncentrāciju Mitruma kontrolparaugus naktī atstāj žūt Nākamajā dienā: mitruma kontrolparaugus nosver Nākamajā dienā: izmēra izžuvušo abiotisko kontrolparaugu pH
3., 6., 9., 12. diena (apm.)	Katrā replikātā nodrošina pietiekamu daudzumu barībā izmantojamu organismu Katru replikātu nosver un pēc vajadzības pievieno ūdeni iztvaikojušā vietā
14. diena	Testu beidz, ar visiem replikātiem un ekstrakcijas efektivitātes kontrolparaugiem sāk ekstrakciju Ūdens satura kontrolparaugus naktī atstāj žūt Nākamajā dienā: ūdens satura kontrolparaugus nosver Nākamajā dienā: izžāvētajiem kontrolparaugiem izmēra pH
16. diena	Ekstrakciju beidz
Pēc 16. dienas	Reģistrē pieaugušo un jauno īpatņu skaitu ekstrahētajā materiālā Rezultātus ieraksta tabulu veidlapās Testēšanas procedūru atspoguļo testa protokola lapās.

▼M6

C.37. ZIVJU 21 DIENAS TESTS: ESTROGĒNISKĀS UN ANDROGĒNISKĀS DARBĪBAS UN AROMATĀZES TRAUCĒJUMU ĪSAIS SKRĪNINGS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 230 (2009. gads). Nepieciešamība izstrādāt un validēt zivju testu, ar kuru nosaka endokrīni aktīvas ķīmiskās vielas, izriet no apsvērumiem, ka ķīmisko vielu līmeņi, ķīmiskajām vielām mijiedarbojoties ar cilvēku un savvaļas dzīvnieku endokrīno sistēmu, var šo sistēmu negatīvi ietekmēt. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu un izstrādātu jaunus. Viens no rīcības elementiem bija izstrādāt testēšanas norādījumus, kā noteikt ķīmiskas vielas ar aktīvu iedarbību uz zivju sugu endokrīno sistēmu. Zivju 21 dienas endokrīnās sistēmas skrīninga tests tika pārbaudīts visaptverošā validācijas programmā, kurā īstenoja starplaboratoriju salīdzinošos pētījumus ar attiecīgām ķīmiskajām vielām, lai pierādītu, ka tests, kurā detektē estrogēniskās darbības un aromatāzes traucējumus izraisošas ķīmiskās vielas trim pētītajām zivju sugām (melnais platgalvis, Japānas medaka (Japānas rīsa zivs) un zebrzivs) (1, 2, 3, 4, 5), ir atbilstīgs un ticams; androgēnisko aktivitāti ir iespējams detektēt melnajam platgalvim un Japānas medakai, bet ne zebrzivij. Šī testēšanas metode nenodrošina iespēju detektēt antiandrogēniskas iedarbības ķīmiskās vielas. Validācijas darbu ir zinātniski recenzējusi ekspertu grupa, kurus izraudzījušies Testēšanas norādījumu programmas izstrādes nacionālie koordinatori (6). Tests nav izstrādāts tā, lai ar to noteiktu hormonālo traucējumu specifiskos mehānismus, jo testa dzīvniekiem nav skarta hipotalāma-hipofīzes-gonādu (*HPG*) ass, tāpēc reaģēšana uz ķīmiskajām vielām, kas iedarbojas uz hipotalāma-hipofīzes-gonādu asi, var notikt dažādā līmenī. Zivju vairošanās īsais tests (ESAO *TG* 229) aptver melnā platgalvja auglību un attiecīgos gadījumos gonādu histopatoloģiju, kā arī šeit aprakstītās testēšanas metodes beigupunktus. ESAO *TG* 229 nodrošina to ķīmisko vielu skrīningu, kas ietekmē vairošanos ar dažādu mehānismu, arī endokrīnās sistēmas mehānismu starpniecību. Tas jāņem vērā, pirms izraugās piemērotāko metodi.

2. Šī testēšanas metode apraksta *in vivo* skrīninga testu, kurā dzimumgatavību sasniegušus zivju tēviņus un nārstojošas mātītes tur kopā un ierobežotā dzīves cikla daļā (21 diena) eksponē kādai ķīmiskai vielai. Pēc 21 dienas ekspozīcijas perioda atkarībā no izmantotās sugas mātītēm un tēviņiem mēra vienu vai divus biomarķieru beigupunktus, kas ir testējamās ķīmiskās vielas estrogēniskās iedarbības, aromatāzi inhibējošās iedarbības vai androgēniskās iedarbības rādītāji; šie beigupunkti ir vitelogenīns un sekundārās dzimumpazīmes. Vitelogenīnu mēra melnajam platgalvim, Japānas medakai un zebrzivij, savukārt sekundārās dzimumpazīmes mēra tikai melnajam platgalvim un Japānas medakai.

3. Šo biotestu izmanto par *in vivo* skrīninga testu attiecībā uz noteiktiem endokrīnas iedarbības veidiem, un to skata kopā ar "OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (28).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. Vitelogenīns parasti veidojas oldējēju mugurkaulnieku mātīšu aknās atbildreakcijā uz organismā cirkulējošo endogēno estrogēnu. Tas ir olas dzeltenuma proteīnu prekursors, kas producējas aknās un pa asinsrites sistēmu nonāk olnīcās, kur to uzņem un modificē attīstošās olšūnas. Nenobriedušu zivju mātīšu un tēviņu plazmā vitelogenīns gandrīz nav detektējams, jo organismā pietiekamā daudzumā nav estrogēna, tomēr aknas vitelogenīnu spēj sintezēt un izdalīt, reaģējot uz eksogēnu estrogēnisku stimulāciju.

▼M6

5. Vitelogenīna mērījumus izmanto, lai detektētu ķīmiskās vielas ar dažādiem estrogēniskās iedarbības veidiem. Estrogēniskas iedarbības ķīmiskās vielas var detektēt, mērot zivju tēviņu organismā producējušos vitelogenīnu, un tas plaši dokumentēts zinātniski recenzētos izdevumos (piemēram, (7)). Vitelogenīna inducēšanās novērota arī pēc eksponēšanas aromatizējamiem androgēniem (8, 9). Zivju mātīšu organismā cirkulējošā estrogēna līmeņa pazemināšanās, piemēram, inhibējoties aromatāzei, kas endogēno androgēnu pārvērš dabiskā estrogēnā 17β-estradiolā, samazina vitelogenīna līmeni, un pēc tā var noteikt aromatāzi inhibējošas ķīmiskas vielas (10, 11). Bioloģiskā nozīme, kas piemīt vitelogenīna atbildreakcijai uz estrogēnu vai aromatāzes inhibēšanu, ir pierādīta un plaši dokumentēta. Tomēr *VTG* izstrādāšanos zivju mātīšu organismā var ietekmēt vispārējais vides toksiskums un neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksicitāte.

6. Sekmīgi izstrādātas un standartizētas ir vairākas plaši izmantojamas mērīšanas metodes. Viens no piemēriem ir katrai sugai specifiskas imūnfermentatīvās analīzes (*ELISA*) metodes, kurās no atsevišķām zivīm ņemtos nelielos asins vai aknu paraugos imūnķīmiskā analīzē kvantitatīvi novērtē vitelogenīna producēšanos (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). *VTG* mērījumiem izmanto melnā platgalvja asinis, zebrzivs asinis vai galvas/astes homogenātu un Japānas medakas aknas. Japānas medakai konstatēta laba korelācija starp *VTG* mērījumiem asinīs un aknās (19). 6. papildinājumā sniegta ieteicamā paraugu ņemšanas kārtība vitelogenīna analīzei. Vitelogenīna mērījumu komplekti ir plaši pieejami; šo komplektu pamatā jābūt validētai katrai sugai specifiskai *ELISA* metodei.

7. Atsevišķu zivju sugu tēviņu sekundārās dzimumpazīmes ir ārēji redzamas, kvantitatīvi novērtējamas un jutīgas pret organismā cirkulējošo endogēno androgēnu līmeni; tas attiecas uz melno platgalvi un Japānas medaku, taču neattiecas uz zebrzivi, kam kvantitatīvi novērtējamas sekundārās dzimumpazīmes nav novērojamas. Mātītēm, kas eksponētas ūdenī esošām androgēniskām ķīmiskām vielām, var attīstīties tēviņu sekundārās dzimumpazīmes. Zinātniskajā literatūrā ir vairāki pētījumi, kuros šāda reakcija dokumentēta attiecībā uz melno platgalvi (20) un Japānas medaku (21). Interpretējot tēviņu sekundāro dzimumpazīmju izpausmju samazināšanos, sakarā ar zemo statistisko ticamību jāsaglabā piesardzība, un jāņem vērā ekspertu viedoklis un pierādījumu nozīmīgums. Zebrzivs izmantošana šajā testā ir ierobežota sakarā ar to, ka tai nav kvantitatīvi novērtējamu sekundāro dzimumpazīmju, kas reaģētu uz androgēniskas iedarbības ķīmiskām vielām.

8. Galvenais rādītājs, kas liecina par melnā platgalvja eksponēšanu eksogēnam androgēnam, ir kārpiņu skaits uz zivju mātītes purna. Japānas medakai galvenais rādītājs, kas liecina par eksogēnu eksponēšanu androgēniskām ķīmiskām vielām, ir kārpiņveida izaugumu skaits zivju mātītēm. 5.A papildinājumā un 5.B papildinājumā norādītas ieteicamās procedūras, kā izvērtēt attiecīgi melnā platgalvja un Japānas medakas dzimumpazīmes.

9. Šajā testēšanas metodē minētās definīcijas ir minētas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

10. Testēšanas laikā reproduktīvā attīstības posmā esošus zivju tēviņus un mātītes kopā eksponē testēšanas traukos. Tā kā dzīvnieki ir pieauguši un reproduktīvā attīstības posmā, iespējams skaidri atšķirt dzimumus un visus beigupunktus analizēt dzimuma griezumā, un tas arī garantē jutību pret eksogēnām ķīmiskajām vielām. Dzimumu apstiprina testa nobeigumā makroskopiskā dzimumdziedzeru izmeklēšanā, kurā ar šķērēm atver vēdera apvidu. Pārskats par būtiskajiem biotesta nosacījumiem sniegts 2. papildinājumā. Testu parasti veic ar zivīm no nārstojošas populācijas; neizmanto dzīvniekus no novecojošām populācijām. Norādījumi par zivju vecumu un reproduktīvo statusu sniegti sadaļā par zivju izraudzīšans. Testu veic ar trim

▼M6

ķīmiskās ekspozīcijas koncentrācijām, un, ja nepieciešams, nodrošina ūdens un šķīdinātāja kontrolgrupas. Katrā Japānas medakas un zebrzivs apstrādē izmanto divus traukus jeb replikātus (katrā traukā 5 tēviņi un 5 mātītes), savukārt katrā melnā platgalvja apstrādē izmanto četrus traukus jeb replikātus (katrā traukā 2 tēviņi un 4 mātītes). Tas nepieciešams, lai pielāgotos melnā platgalvja tēviņu teritoriālajai uzvedībai, vienlaikus saglabājot pietiekamu testa jaudu. Ekspozīcijas ilgums ir 21 diena, un zivju paraugus ņem ekspozīcijas 21. dienā.

11. Ņemot paraugus 21. dienā, visus dzīvniekus humāni nonāvē. Melnajam platgalvim un Japānas medakai mēra sekundārās dzimumpazīmes (sk. 5.A papildinājumu un 5.B papildinājumu); ar asins paraugiem nosaka vitelogenīna līmeni zebrzivs un melnā platgalvja organismā, bet vitelogenīna līmeni zebrzivs organismā var noteikt arī ar galvas/astes paraugiem (6. papildinājums); Japānas medakas *VTG* analīzē izmanto aknu paraugus (6. papildinājums).

TESTA PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI

12. Lai testa rezultāti būtu derīgi, jāizpilda šādi kritēriji:

— ekspozīcijas perioda beigās mirstība ūdens (vai šķīdinātāja) kontrolgrupā nepārsniedz 10 %;

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā ekspozīcijas periodā jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma koncentrācijas;

— ūdens temperatūras atšķirība starp testēšanas tvertnēm jebkurā ekspozīcijas perioda brīdī nepārsniedz ± 1,5 °C, un testa sugām norādītajos temperatūras diapazonos (2. papildinājums) to uztur 2 °C svārstību diapazonā;

— ir pieejami dati, kas liecina, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija šķīdumā ir uzturēta vidējo izmērīto vērtību diapazonā ± 20 %.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

13. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a) skābekļa mērīšanas iekārtas un pH metri;

b) aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;

c) attiecīgs aprīkojums ūdens temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktai uzraudzībai;

d) ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un apdzīvotības blīvumu (sk. 2. papildinājumu);

e) melnā platgalvja un zebrzivis nārsta substrāts, nepieciešamā informācija sniegta 4. papildinājumā;

f) pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti ± 0,5 mg).

▼M6

Ūdens

14. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, kompleksējoties ar testējamo ķīmisko vielu), paraugus tā analīzei ņem ar noteiktiem starplaikiem. Ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} un SO_4^{2-}), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cieto daļiņu mērījumi jāizdara, piemēram, reizi trijos mēnešos. Ja ir pierādīts, ka vismaz viena gada laikā ūdens kvalitāte ir nemainīga, noteikšanu var veikt retāk un intervāli var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos). Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir norādīti 3. papildinājumā.

Testēšanas šķīdumi

15. Izraudzītās koncentrācijas testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams pagatavot, testējamo ķīmisko vielu atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, kratīšana vai apstrāde ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas). Nav ieteicams par nesējvielu izmantot šķīdinātāju. Tomēr, ja šķīdinātājs ir nepieciešams, vienlaikus nodrošina šķīdinātāja kontrolgrupu, kurai šķīdinātāja koncentrācija ir tāda pati kā grupām, ko apstrādā ar ķīmisko vielu. Sarežģīti testējamām ķīmiskajām vielām šķīdinātājs var būt labākais tehniskais risinājums; jāizmanto *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* (22). Šķīdinātāju izraugās atkarībā ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām. Jāievēro ESAO Norādījumu dokumentā ieteiktā maksimālā koncentrācija 100 µl/l. Tomēr nesen publicētā pārskatā (23) pausti papildu apsvērumi attiecībā uz šķīdinātāju izmantošanu endokrīnās sistēmas darbības testēšanā. Tāpēc, ja nepieciešams, tehniski pamatotās situācijās šķīdinātāja koncentrāciju samazina līdz minimumam (atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām).

16. Testēšanā izmanto caurplūdes sistēmu. Šāda sistēma (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma) nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdumu, lai testēšanas tvertnēs nodrošinātu nemainīgu koncentrāciju. Testa laikā noteiktos intervālos, vēlams, reizi dienā, jāpārbauda izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūde, un testa laikā tā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Jāraugās, lai neizmantotu nekvalitatīvas plastmasas caurules vai citus materiālus, kas satur bioloģiski aktīvas ķīmiskās vielas. Izraugoties caurplūdes sistēmas materiālu, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas iespējama adsorbēšanās uz materiāla.

Zivju turēšana

17. Testa zivis izvēlas no laboratorijas populācijas, vēlams, no viena bara, kas vismaz divas nedēļas pirms testa ir aklimatizējies testa apstākļiem līdzīgos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos. Svarīgi, lai noslogojums un apdzīvotības blīvums (sk. 1. papildinājumu) būtu izmantotajai testa sugai piemēroti (sk. 2. papildinājumu).

18. Pēc 48 stundu sākumposma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:

▼M6

— mirstība septiņās dienās ir lielāka par 10 % populācijas: grupu tālākai testēšanai neizmanto;

— mirstība ir no 5 % līdz 10 % no populācijas: grupu aklimatizē vēl septiņas dienas; ja mirstība otru septiņu dienu laikā pārsniedz 5 %, grupu tālākai testēšanai neizmanto;

— mirstība septiņās dienās ir mazāka par 5 % no populācijas: grupu izmanto tālākai testēšanai.

19. Aklimatizācijas laikā, pirmsekspozīcijas un ekspozīcijas periodā zivis nedrīkst medikamentozi ārstēt.

Pirmsekspozīcijas periods un zivju izraudzīšanās

20. Ieteicams vienas nedēļas pirmsekspozīcijas periods, kurā zivis ievieto testēšanas traukiem līdzīgos traukos. Zivis visā turēšanas laikā un ekspozīcijas fāzē baro *ad libitum*. Ekspozīcijas fāzi sāk ar aktīvi nārstojošām pieaugušām zivīm, kurām ir skaidri izteiktas dzimumatšķirības un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem (piemēram, ja testē melno platgalvi un Japānas medaku – ar skaidri redzamām sekundārajām dzimumpazīmēm,). Tikai vispārīgu norādījumu līmenī (šos norādījumus nedrīkst izvērtēt atrauti no attiecīgās zivju grupas faktiskā reproduktīvā statusa) melnajiem platgalvjiem jābūt aptuveni 20 (± 2) nedēļas veciem, pieņemot, ka tie visā dzīves ciklā audzēti 25 ± 2 °C temperatūrā. Japānas medakām vajadzētu būt aptuveni 16 (± 2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 25 ± 2 °C temperatūrā. Zebrzivīm vajadzētu būt aptuveni 16 (± 2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 26 ± 2 °C temperatūrā.

TESTĒŠANAS PLĀNS

21. Izmanto trīs testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas, vienu kontrolgrupu (ūdens) un, ja nepieciešams, vienu šķīdinātāja kontrolgrupu. Šos datus var analizēt, lai noteiktu, vai starp apstrādes grupu un kontrolgrupu rezultātiem ir vērojamas statistiski būtiskas atšķirības. Šo analīžu mērķis nav tās izmantot riska novērtēšanā (24), bet gan gūt informāciju par to, vai jāturpina testēt ķīmiskās vielas kaitīgā ietekme (t. i., attiecībā uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un vairošanos).

22. Attiecībā uz Japānas medaku un zebrzivi eksperimenta 21. dienā no katra apstrādes līmeņa un no kontrolgrupas(-ām) paraugam ņem tēviņus un mātītes (5 tēviņus un 5 mātītes no katra no diviem replikātiem), lai mērītu vitelogenīnu un attiecīgā gadījumā sekundārās dzimumpazīmes. Attiecībā uz melno platgalvi ekspozīcijas 21. dienā paraugam ņem tēviņus un mātītes (2 tēviņus un 4 mātītes no katra no četriem replikātiem), arī no kontrolgrupas(-ām), lai mērītu vitelogenīnu un gadījumā sekundārās dzimumpazīmes.

Testa koncentrāciju izvēle

23. Šā testa vajadzībām augstākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir vai nu diapazona noteikšanā vai no citiem toksicitātes datiem noteiktā maksimāli pieļaujamā koncentrācija (turpmāk "MPK"), vai 10 mg/l, vai maksimālā šķīdība ūdenī – atkarībā no tā, kurš no šiem rādītājiem ir zemākais. MPK definē kā ķīmiskās vielas augstāko testējamo koncentrāciju, kuras izraisītā mirstība ir mazāka nekā 10 %. Šīs pieejas izmantošanai ir nepieciešami jau pieejami empīriski dati par akūto toksicitāti vai citi toksicitātes dati, ar kuriem iespējams noteikt MPK. MPK noteikšana var būt neprecīza, un parasti ir nepieciešams profesionāls viedoklis.

▼M6

24. Ir nepieciešamas trīs testa koncentrācijas ar nemainīgu intervāla koeficientu, kas nepārsniedz 10, un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupa (un, ja vajadzīgs, šķīdinātāja kontrolgrupa). Ieteicamie intervāla koeficienti ir no 3,2 līdz 10.

PROCEDŪRA

Testa zivju izvēle un svēršana

25. Ir svarīgi testa sākumā līdz minimumam samazināt zivju svara atšķirības. Piemērots izmēru diapazons dažādām sugām, ko ieteicams izmantot šajā testā, ir norādīts 2. papildinājumā. Visās testēšanā izmantoto zivju grupās katra atsevišķā zivju tēviņa un mātītes svara diapazons testa sākumā, ja iespējams, nepārsniedz ± 20 % no attiecīgā dzimuma vidējā aritmētiskā svara. Ir ieteicams pirms testēšanas nosvērt apakšparaugu no kopējā zivju parauga, lai novērtētu vidējo svaru.

Ekspozīcijas apstākļi

Ilgums

26. Testa ilgums ir 21 diena pēc pirmsekspozīcijas perioda. Ieteicamais pirmsekspozīcijas periods ir viena nedēļa.

Barošana

27. Zivis *ad libitum* baro ar piemērotu barību (2. papildinājums) pietiekamā daudzumā, lai uzturētu ķermeņa stāvokli. Jāraugās, lai nepieļautu mikrobu augšanu un ūdens duļķainību. Vispārīgs ieteikums ir vienas dienas barības devu sadalīt divās vai trīs vienādās daļās un dienā zivīm izbarot vairākās reizēs ar vismaz triju stundu starplaiku. Ir pieņemama viena lielāka dienas deva, jo īpaši nedēļas nogalēs. 12 stundas pirms paraugu ņemšanas vai autopsijas zivis nebaro.

28. Izvērtē, vai zivju pārtikā nav piesārņotāju, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk "PAO") un polihlorbifenilu (turpmāk "PHB"). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu fitoestrogēnu līmeni, kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju uz zināmu estrogēnu agonistu (piemēram, 17-bētaestradiolu).

29. Neapēstā barība un fekālijas no testēšanas traukiem jāizņem vismaz divas reizes nedēļā, piemēram, katras tvertnes apakšdaļu rūpīgi iztīrot caur sifonu.

Gaisma un temperatūra

30. Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpielāgo testa sugai (sk. 2. papildinājumu).

Analītiskās noteikšanas un mērījumu biežums

31. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķīmiskās vielas piegādes sistēmas darbība. Jābūt apzinātām visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm, nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķīmisko stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas nosaka šādos regulāros intervālos: atšķaidīšanas ūdens un izejšķīduma caurplūdi vēlams pārbaudīt katru dienu, taču ne retāk kā divas reizes nedēļā, un testa laikā tās nedrīkst mainīties vairāk nekā par 10 %. Ir ieteicams katrā tvertnē noteikt faktisko testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju testa sākumā un reizi nedēļā pēc tam.

32. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja visā testa laikā šķīdumā ir uzturēta apmierinoša testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ± 20 % no nominālās koncentrācijas, rezultātu var balstīt uz nominālajām vai izmērītajām vērtībām.

33. Paraugiem var būt vajadzīga filtrēšana (piemēram, ar poru lielumu 0,45 μm) vai centrifugēšana. Vajadzības gadījumā ieteicama centrifugēšana. Tomēr arī filtrēšana var būt pieņemama, ja testēšanas materiāls neadsorbējas uz filtra.

▼M6

34. Testa laikā visos traukos vismaz reizi nedēļā nosaka izšķīdušo skābekli, temperatūru un pH. Vismaz reizi nedēļā kontrolgrupā un vienā traukā ar lielāko koncentrāciju nosaka kopējo cietību un sārmainību. Vismaz vienā testēšanas traukā vēlams pastāvīgi uzraudzīt temperatūru.

Novērojumi

35. Testa laikā vai pēc tā beigām novērtē vairākas vispārīgas atbildreakcijas (piemēram, izdzīvotību) un bioloģiskās atbildreakcijas (piemēram, vitelogenīna līmeņus). Turpmāk aprakstīta šo beigupunktu mērīšana, izvērtēšana un lietderība.

Izdzīvotība

36. Zivis testēšanas laikā katru dienu jāapskata, jāreģistrē mirstība un nedzīvās zivis iespējami drīz jāizvāc. Nedzīvās zivis neaizstāj ne ar kontrolgrupas zivīm, ne ar zivīm no cita apstrādes trauka. Dzimumdziedzeru makroskopiskā izmeklēšanā nosaka testēšanas laikā mirušo zivju dzimumu.

Izturēšanās un izskats

37. Jāreģistrē jebkāda anormāla izturēšanās (salīdzinājumā ar kontrolgrupām); tās var būt vispārējas toksicitātes pazīmes, tostarp hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, līdzsvara zudums un netipisks mierīgums vai barošanās. Jāreģistrē arī izskata anomālijas (piemēram, asinsizplūdumi, krāsas zaudēšana). Datu interpretēšanā šādas toksicitātes pazīmes jāvērtē uzmanīgi, jo tās var liecināt par koncentrācijām, kurās nevar paļauties uz endokrīnās sistēmas biomarķieriem. Šādos novērojumos par izturēšanos var iegūt arī noderīgu kvantitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamas vajadzības zivju testēšanā. Piemēram, novērots, ka androgēnām vielām eksponēti melnā platgalvja tēviņi vai maskulinizētas mātītes izturas teritoriāli agresīvi, savukārt zebrzivīm estrogēniskas vai antiandrogēniskas ekspozīcijas rezultātā samazinās vai kavējas ierastā pārošanās un nārstošanas aktivitāte pēc rītausmas.

38. Tā kā izskatu noteiktos aspektos (galvenokārt krāsu) var ātri mainīt manipulācijas, kvalitatīvos novērojumus svarīgi veikt pirms dzīvnieku izņemšanas no testa sistēmas. Līdzšinējā pieredze ar melnajiem platgalvjiem liecina, ka atsevišķas endokrīni aktīvas ķīmiskās vielas sākotnēji var mainīt šādas ķermeņa ārējās pazīmes: krāsu (gaiša vai tumša), krāsojuma struktūru (vertikālu joslu esamība) un ķermeņa formu (galvas un krūšu daļa). Tāpēc zivju izskats jānovēro visā testēšanas laikā un pētījuma noslēgumā.

Humāna zivju nonāvēšana

39. Testa 21. dienā, t. i., beidzot ekspozīciju, zivis eitanazē ar pietiekamu daudzuma trikaīna (trikaīna metāna sulfonāts, metakaīns, MS-222 (CAS 886-86-2)) daudzumu, 100-500 mg/l gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaidot ar 300 mg/l $NaHCO_3$ (nātrija bikarbonāts, CAS 144-55-8); pēc tam ņem asins vai audu paraugus, lai noteiktu vitelogenīna daudzumu, kā paskaidrots sadaļā par vitelogenīnu.

▼M6

Sekundāro dzimumpazīmju novērtēšana

40. Dažas endokrīni aktīvas ķīmiskās vielas var mainīt specifiskas sekundāras dzimumpazīmju izmaiņas (melnā platgalvja tēviņu nārsta kārpiņu skaits, Japānas medakas tēviņu kārpiņveida izaugumi). Zīmīgi, ka ķīmiskās vielas ar noteikta veida iedarbību pretējā dzimuma dzīvniekiem var inducēt anormālas sekundārās dzimumpazīmes, piemēram, androgēna receptoru agonistu, piemēram, trenbolona, metiltestosterona un dihidrotestosterona, ietekmē melnā platgalvja mātītēm var sākt veidoties nārsta kārpiņas, bet Japānas medakas mātītēm – kārpiņveida izaugumi (11, 20, 21). Ir ziņas arī par to, ka estrogēna receptoru agonisti pieaugušiem tēviņiem var samazināt nārsta kārpiņu skaitu un pakauša segmenta lielumu (25, 26). Šādu izteiktu morfoloģisko īpatnību novērojumi var sniegt arī noderīgu kvalitatīvu un kvantitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamas vajadzības zivju testēšanā. Melnā platgalvja nārsta kārpiņu skaitu un lielumu un Japānas medakas kārpiņveida izaugumu skaitu kvantitatīvi noteikt var uzreiz vai, praktiskāk, saglabātiem paraugiem. Melnā platgalvja un Japānas medakas sekundāro dzimumpazīmju noteikšanai ieteicamās procedūras norādītas attiecīgi 5.A un 5.B papildinājumā.

Vitelogenīns (VTG)

41. Ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārcaurulīti vai kardiālās punkcijas šļirci no astes artērijas/vēnas ņem asinis. Atkarībā no zivs lieluma no viena melnā platgalvja parasti ņem 5 līdz 60 µl un no zebrzivs – 5 līdz 15 µl. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot, un līdz vitelogenīna analīžu veikšanai, pievienojot proteāzes inhibitorus, glabā – 80 °C temperatūrā. Par audu avotu vitelogenīna noteikšanai var izmantot arī Japānas medakas aknas un zebrzivs galvas vai astes homogenātu (6. papildinājums). *VTG* mērījuma pamatā jābūt validētai homologai *ELISA* metodei, kurā izmanto homologu *VTG* standartvielu un homologas antivielas. Ieteicams izmantot metodi, ar ko ir iespējams konstatēt *VTG*, kura daudzums ir tikai daži ng/ml plazmā (vai ng/mg audos), kas atbilst fona līmenim testēšanaā neeksponētu zivs tēviņu organismā.

42. Vitelogenīna analīzes kvalitātes kontrolē izmanto standartvielas, sagataves un vismaz atkārtotas analīzes. Lai noteiktu minimālo parauga atšķaidījuma koeficientu, attiecībā uz katru *ELISA* metodi jātestē matrices ietekme (paraugatšķaidījuma ietekme). Katrā *VTG* testos izmantotā *ELISA* testa platē jābūt šādiem kvalitātes kontroles paraugiem: vismaz 6 kalibrācijas etaloni, kas atbilst paredzamo vitelogenīna koncentrāciju diapazonam, un vismaz viens nespecifisks saistīšanās testa "tukšais paraugs" (analizē dublikātparaugu). Absorbcijai šajos tukšajos paraugos jābūt zemākai par 5 % no absorbcijas, kas vērojama maksimālās kalibrācijas etalonam. No katra parauga atšķaidījuma analizē vismaz divas alikvotas (dublikātiedobes). Dublikātiedobes, kas atšķiras vismaz par 20 %, jāanalizē atkārtoti.

43. Kalibrācijas līkņu korelācijas koeficientam (R^2) jābūt lielākam nekā 0,99. Tomēr ar augstu korelāciju nepietiek, lai garantētu pietiekamu koncentrācijas prognozēšanu visos diapazonos. Papildus tam, ka jābūt pietiekami augstai korelācijai kalibrācijas līknē, katrai standartkoncentrācijai, ko aprēķina pēc kalibrācijas līknes, jābūt 70 līdz 120 % nominālās koncentrācijas.

▼M6

Ja nominālajām koncentrācijām ir tendence attālināties no kalibrācijas regresijas līknes (piemēram, zemākās koncentrācijās), kalibrācijas līkni var būt nepieciešams sadalīt zemajā un augstajā diapazonā vai izmantot nelineāru modeli, lai pietiekami iekļautu absorbcijas datus. Ja līkne tiek sadalīta, abos līknes segmentos jābūt $R^2 > 0,99$.

44. Detektēšanas robeža (turpmāk "DR") ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, bet kvantitatīvās noteikšanas robeža (turpmāk "KNR") ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, kas reizināta ar zemāko atšķaidījuma koeficientu.

45. Katru dienu, kad veic vitelogenīna testus, analizē stiprinātu paraugu, kas gatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu (7. papildinājums). Prognozētās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību testēšanas pārskatā norāda kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testu kompleksa rezultātiem.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Biomarķieru reakcijas novērtēšana ar dispersijas analīzi (turpmāk "ANOVA")

46. Lai noteiktu ķīmiskās vielas iespējamu endokrīnu iedarbību, dažādās apstrādes grupās un kontrolgrupās iegūtā atbildreakcija jāsalīdzina, izmantojot dispersijas analīzi *(ANOVA)*. Ja izmanto šķīdinātāja kontrolgrupu, attiecīgu statistisku testu, kurā salīdzina atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, veic attiecībā uz katru beigupunktu. Norādījumi par to, kā ar datiem par atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu jārīkojas turpmākajā statistiskajā analīzē, atrodami *OECD, 2006c* (27). Visi bioloģiskās atbildreakcijas dati jāanalizē un testēšanas pārskatā jāiekļauj par katru dzimumu. Ja neizpildās parametriskajām metodēm vajadzīgie pieņēmumi – dati neatbilst normālajam sadalījumam (piemēram, Šapiro-Vilka tests (*Shapiro-Wilk's test*)) vai ir vērojama heterogēna dispersija (Bartleta tests (*Bartlett's test*) vai Levena tests (*Levene's test*)), jāapsver, vai pirms *ANOVA* veikšanas dati nebūtu jāpārveido, lai dispersijas homogenizētu, vai varbūt jāveic svērta *ANOVA*. Devas un atbildreakcijas nemonotonas sakarības gadījumā var izmantot Daneta (parametrisko) testu, kurā salīdzina vairākus pārus, vai Manna-Vitnija (*Mann-Whitney*) testu ar Bonferoni (*Bonferroni*) (neparametrisku) korekciju. Ja devas un atbildreakcijas sakarība ir aptuveni monotona, var izmantot citus statistiskos testus (piemēram, Džonkhīra-Terpstra testu (*Jonckheere-Terpstra test*) vai Viljamsa testu (*Williams test*)). Lai būtu vieglāk lemt, kurš statistiskais tests būtu vispiemērotākais, 8. papildinājumā sniegta statistiska diagramma. Papildu informācija pieejama arī ESAO "Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data" (27).

Ziņojums par testa rezultātiem

47. Pētījuma rezultātos iekļauj šādu informāciju.

Testēšanas komplekss:

— atbildīgie darbinieki un viņu pienākumi pētījumā;

— katra laboratorija ir pierādījusi kvalifikāciju, izmantojot vairākas reprezentatīvas ķīmiskās vielas.

Testējamā ķīmiskā viela:

— testējamās ķīmiskās vielas apraksts;

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

▼**M6**

— testa koncentrāciju pagatavošanas metode un biežums;

— informācija par stabilitāti un bionoārdāmību.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja apraksts (īpašības, izmantotā koncentrācija);

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums (ja šķīdinātājs nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

— sugas un līnija;

— piegādātājs un konkrētā piegādātājiestāde;

— zivju vecums testa sākumā un reproduktīvais/nārstošanas statuss;

— dati par dzīvnieku aklimatizācijas procedūru;

— zivju ķermeņa svars ekspozīcijas sākumā (zivju parauga apakšparaugs).

Testēšanas apstākļi:

— izmantotā testēšanas procedūra (testa tips, noslogojums, apdzīvotības blīvums u. c.);

— izejšķīdumu pagatavošanas metode un caurplūdes;

— nominālās testa koncentrācijas, iknedēļas izmērītās testa šķīdumu koncentrācijas un izmantotā analīzes metode, mērījumu vidējās vērtības un standartnovirzes testa traukos un pierādījumi tam, ka mērījumi raksturo testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens īpašības (tostarp pH, cietība, sārmainība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmenis, kopējais organiskais ogleklis, suspendētas cietās daļiņas un citi veiktie mērījumi);

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— detalizēta informācija par barošanu (piemēram, barības(-u) veids(-i), avots, izbarotais daudzums un barošanas biežums, kā arī attiecīgo piesārņotāju (piemēram, PHB, PAO un hlororganisko pesticīdu) analīzes, ja tādas ir veiktas)

Rezultāti:

— apliecinājums, ka kontrolgrupas atbildušas testa pieņemamības kritērijiem;

— dati par mirstību ar jebkuru no testa koncentrācijām un kontrolgrupās;

— izmantotās statistiski analītiskās metodes, datu apstrāde un izmantoto metožu pamatojums;

— bioloģisko novērojumu dati par morfoloģiskajām pazīmēm, tostarp sekundārajām dzimumpazīmēm un vitelogenīnu;

▼M6

— datu analīzes rezultāti, ieteicams – tabulu un grafiku veidā;

— novērojumi par zivju neraksturīgu izturēšanos un jebkāda redzama testējamās ķīmiskās vielas izraisīta ietekme.

NORĀDĪJUMI PAR REZULTĀTU INTERPRETĀCIJU UN PIEŅEMAMĪBU

48. Šajā sadaļā sniegti daži apsvērumi, kas jāņem vērā testa rezultātu interpretēšanā attiecībā uz dažādajiem mērītajiem beigupunktiem. Ja rezultāti liecina, ka testējamā ķīmiskā viela izraisa acīmredzamu toksicitāti vai ietekmē testa dzīvnieka vispārīgo stāvokli, tie jāinterpretē piesardzīgi.

49. Nosakot testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju diapazonu, jāraugās, lai netiktu pārsniegta maksimālā pieļaujamā koncentrācija, pie kuras iespējama jēgpilna datu interpretācija. Ir svarīgi veikt vismaz vienu apstrādi, kurā testējamās ķīmiskās vielas ietekmes pazīmes nav vērojamas. Slimību un toksiskas ietekmes pazīmes rūpīgi jānovērtē un jāatspoguļo ziņojumā. Piemēram, iespējams, ka *VTG* producēšanos zivju mātīšu organismā ietekmē arī vispārīgs vides toksiskums vai neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksicitāte. Tomēr interpretāciju par ietekmi var nostiprināt, izmantojot citus koncentrācijas līmeņus, kuros sistēmiskas toksicitātes maldinoša ietekme nav vērojama.

50. Attiecībā uz testa rezultātu pieņemamību jāņem vērā vairāki aspekti. Vispārīgs norādījums ir tāds, ka tēviņu un mātīšu organismā *VTG* līmeņiem kontrolgrupās attiecībā uz melnajiem platgalvjiem un zebrzivīm jābūt izteiktiem un jāatšķiras aptuveni trīs reizes un attiecībā uz Japānas medakām – aptuveni par vienu lieluma kārtu. Kontrolgrupās un apstrādes grupās novēroto vērtību diapazonu piemēri ir pieejami validācijas pārskatos (1, 2, 3, 4). Augstas *VTG* vērtības kontrolgrupas tēviņu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un spēju konstatēt vājus estrogēna agonistus. Zemas *VTG* vērtības kontrolgrupas mātīšu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un spēju konstatēt aromatāzes inhibitorus un estrogēna antagonistus. Norādījumos ir izmantoti validācijas pētījumi.

51. Ja laboratorija šādu testu iepriekš nav veikusi vai ja ir notikušas būtiskas pārmaiņas (piemēram, mainītas zivju līnijas vai piegādātājs), ir ieteicams veikt tehniskās kvalifikācijas pētījumu. Ieteicams izmantot ķīmiskās vielas ar atšķirīgu iedarbības veidu vai ietekmi uz testa beigupunktiem. Katrai laboratorijai būtu jāapkopo vēsturiski dati par tēviņu un mātīšu kontrolgrupām un jāveic tests ar pozitīvu ķīmisku kontrolvielu, kurai ir zināma estrogēniska iedarbība (piemēram, 17β-estradiols koncentrācijā 100 ng/l koncentrācijā vai zināms vājš agonists) un kura paaugstina *VTG* līmeni zivju tēviņu organismā, ar pozitīvu ķīmisku kontrolvielu, kura inhibē aromatāzi (piemēram, fadrozols vai prohlorāzs koncentrācijā 300 µg/l) un kura pazemina *VTG* līmeni zivju mātīšu organismā, un pozitīvu ķīmisku kontrolvielu, kurai ir androgēniska iedarbība (piemēram, 17β-trenbolons koncentrācijā 5 µg/l koncentrācijā) un kura ierosina sekundāro dzimumpazīmju veidošanos melnā platgalvja un Japānas medakas mātītēm. Šos datus var salīdzināt ar pieejamiem validācijas pētījumu datiem (1, 2, 3), lai būtu drošība par laboratorijas kvalifikāciju.

52. Kopumā vitelogenīna mērījumi jāuzskata par pozitīviem, ja salīdzinājumā ar kontrolgrupu vismaz augstākajā testēto vielu koncentrācijas līmenī ir konstatēts statistiski nozīmīgs *VTG* palielinājums ($p<0,05$) tēviņu organismā vai statistiski nozīmīgs *VTG* samazinājums ($p<0,05$) mātīšu organismā, un vispārīgas toksicitātes pazīmes nav novērojamas. Pozitīvus rezultātus pamato, pierādot bioloģiski ticamu sakarību starp devu un atbildreakcijas līkni. Kā norādīts iepriekš, ne viss vitelogenīna samazinājums var būt endokrīnas cilmes, tomēr pozitīvs rezultāts kopumā jāinterpretē kā liecība par endokrīnu darbību *in vivo*, un šādā gadījumā parasti ir jāveic papildu izmeklējumi, lai precizētu rezultātus.

▼**M6**

LITERATŪRA

(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 1B). 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 (atvērts 18.09.2008.).

(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. lpp.

(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 17ß-estradiol and 17ß-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, 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 and 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: 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 and 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. papildinājums

SAīsinājumi un definīcijas

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

VK ir variācijas koeficients.

ELISA ir imūnfermentatīvā analīze.

Noslogojums ir kopējais zivju mitro paraugu svars vienā ūdens tilpuma vienībā.

Apdzīvotības blīvums ir zivju skaits vienā ūdens tilpuma vienībā.

VTG (vitelogenīns) ir olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas organismā seksuāli aktīvām mugurkaulnieku mātītēm, kuras dēj olas/nērš ikrus.

HPG ass ir hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

MPK: maksimāli pieļaujamā koncentrācija, kas atbilst aptuveni 10 % no letālās koncentrācijas LK_{50}.

Testējamā ķīmiskā viela: ir jebkura viela vai vielu maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Zivju endokrīnās sistēmas skrīninga testa eksperimentālie apstākļi

1. Ieteicamās sugas	**Melnais platgalvis** (*Pimephales promelas*)	**Japānas medaka** (*Oryzias latipes*)	**Zebrzivs** (*Danio rerio*)
2. Testa veids	Caurplūde	Caurplūde	Caurplūde
3. Ūdens temperatūra	25 ± 2°C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Apgaismojuma kvalitāte	Luminiscences spuldzes (plaša spektra)	Luminiscences spuldzes (plaša spektra)	Luminiscences spuldzes (plaša spektra)
5. Gaismas intensitāte	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijas telpā)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijas telpā)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijas telpā)
6. Fotoperiods (rītausmas/krēslas pārejas ir ieteicamas, taču netiek neuzskatītas par nepieciešamām)	16 h gaisma, 8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa
7. Noslogojums	<5 g uz l	<5 g uz l	<5 g uz l
8. Testa kameras izmērs	10 l (minimālais izmērs)	2 l (minimālais izmērs)	5 l (minimālais izmērs)
9. Testa šķīduma tilpums	8 l (minimālais izmērs)	1,5 l (minimālais izmērs)	4 l (minimālais izmērs)
10. Testa šķīdumu tilpuma apmaiņu skaits	Vismaz 6 dienā	Vismaz 5 dienā	Vismaz 5 dienā
11. Testa organismu vecums	Sk. 20. punktu.	Sk. 20. punktu.	Sk. 20. punktu.
12. Pieaugušu zivju aptuvenais mitrā parauga svars (g)	Mātītes: 1,5 ± 20 % Tēviņi: 2,5 ± 20 %	Mātītes: 0,35 ± 20 % Tēviņi: 0,35 ± 20 %	Mātītes: 0,65 ± 20 % Tēviņi: 0,4 ± 20 %
13. Zivju skaits testa traukā	6 (2 tēviņi un 4 mātītes)	10 (5 tēviņi un 5 mātītes)	10 (5 tēviņi un 5 mātītes)
14. Apstrāžu skaits	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)
15. Trauku skaits katrā apstrādē	Vismaz 4	Vismaz 2	Vismaz 2
16. Zivju skaits uz katru testa koncentrāciju	16 pieaugušas mātītes un 8 tēviņi (4 mātītes un 2 tēviņi katrā replikāta traukā)	10 pieaugušas mātītes un 10 tēviņi (5 mātītes un 5 tēviņi katrā replikāta traukā)	10 pieaugušas mātītes un 10 tēviņi (5 mātītes un 5 tēviņi katrā replikāta traukā)
17. Barošanas režīms	Dzīvas vai saldētas pieaugušas vai nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā *(ad libitum)*, tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā *(ad libitum)*, tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā *(ad libitum)*, tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija

▼**M6**

18. Aerācija	Nepiesātina, ja IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no piesātinājuma ar gaisu	Nepiesātina, ja IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no piesātinājuma ar gaisu	Nepiesātina, ja IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no piesātinājuma ar gaisu
19. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors
20. Pirmsekspozīcijas laiks	Ieteicams 7 dienas	Ieteicams 7 dienas	Ieteicams 7 dienas
21. Ķīmiskās vielas ekspozīcijas ilgums	21 diena	21 diena	21 diena
22. Bioloģiskie beigupunkti	izdzīvotība izturēšanās sekund. dzimumpazīmes *VTG*	izdzīvotība izturēšanās sekund. dzimumpazīmes *VTG*	izdzīvotība izturēšanās *VTG*
23. Testa pieņemamība	Izšķīdušais skābeklis >60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 25 ± 2 °C; izdzīvotība 90 % no zivīm kontrol grupās; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī	Izšķīdušais skābeklis >60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 24 ± 2 °C; izdzīvotība 90 % no zivīm kontrolgrupās; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī	Izšķīdušais skābeklis >60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 26 ± 2 °C; izdzīvotība 90 % no zivīm kontrolgrupās; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējiem izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī

▼**M6**

3. papildinājums

Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības

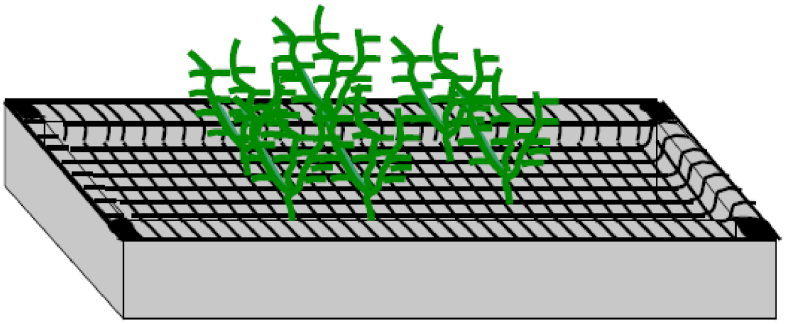
Sastāvdaļa	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikušais hlors	< 10µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

▼M6

4.A papildinājums

ZEBRZIVS NĀRSTA SUBSTRĀTS

Nārstošanas paplāte: stikla instrumentu trauks, piemēram, 22 × 15 × 5.5 cm (g × p × dz), kas pārklāts ar noņemamu nerūsošā tērauda sietiņu (acs platums 2 mm). Sietiņam instrumentu trauka atvere jāpārklāj līdz noteiktam līmenim zem trauka malas.



Uz sietiņa fiksē nārsta substrātu. Jānodrošina iespēja zivīm to izmantot, piemēram, izmantojot mākslīgus akvārija augus, kas izgatavoti no zaļas plastmasas materiāla (NB: jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas iespējamā adsorbēšanās uz plastmasas materiāla). Plastmasas materiāls jāskalo pietiekamā daudzumā silta ūdens, lai nodrošinātu, ka testa ūdenī nenonāk nekādas ķīmiskas vielas. Ja izmanto stikla materiālus, jāgādā, ka zivis enerģisku kustību laikā netiek savainotas vai saspiestas.

Attālumam starp paplāti un tvertnes sienām jābūt vismaz 3 cm, lai nodrošinātu, ka nārstošana nenotiek ārpus paplātes. Uz paplātes iznērstie ikri izkrīt cauri sietiņam, un 45–60 minūtes pēc apgaismošanas sākuma no tiem var ņemt paraugus. Caurspīdīgie ikri ir nelīpoši, un šķērsgaismā tos var viegli saskaitīt. Ja katrā traukā izmanto piecas mātītes, līdz 20 ikriem dienā uzskatāms par zemu, līdz 100 – par vidēju, bet vairāk nekā 100 – par augstu rādītāju. Nārsta paplāte jāizņem, ikri jāsavāc, un nārsta paplāte iespējami vēlu vakarā vai ļoti agri no rīta jāievieto atpakaļ testa traukā. Laiks līdz atpakaļievietošanai nedrīkstētu pārsniegt vienu stundu, citādi nārsta substrāta ievietošana var ierosināt individuālu pārošanos un nārstošanu neraksturīgā laikā. Ja ir kādi apstākļi, kuru dēļ paplāte jāievieto vēlāk, tas jāizdara vismaz 9 stundas pēc apgaismošanas sākuma. Tik vēlu dienā nārstošana vairs netiek ierosināta.

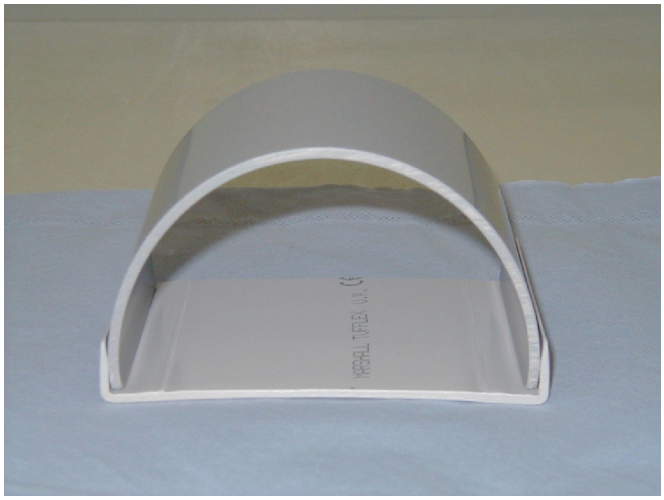
▼**M6**

4.B papildinājums

Melnā platgalvja nārsta substrāts

Katrā testa kamerā ievieto divas vai trīs kombinētas plastmasas/keramikas/stikla vai nerūsošā tērauda nārsta flīzes vai paplātes (piemēram, 80 mm garu pelēku pusapļa caurulīti, kas novietota uz 130 mm garas paplātes ar atlokiem) (sk. attēlu). Ir pierādīts, ka nārsta substrātam ir piemērotas attiecīgi sagatavotas PVC vai keramikas flīzes *(Thorpe et al, 2007)*.

Lai uzlabotu saķeri/pielipšanu, flīzes ieteicams padarīt abrazīvas. Paplātei ir vajadzīgs siets, lai zivis nevarētu piekļūt nokritušajiem ikriem, ja vien nav pierādīts, ka ikri efektīvi līp pie izmantotā nārsta substrāta.



Pamatne ir veidota tā, lai saturētu ikrus, kas nepielīp pie flīžu virsmas un nokrīt līdz tvertnes dibenam (vai ikrus, kas iznērsti tieši uz plakanās plastmasas pamatnes). Visus nārsta substrātus pirms izmantošanas vismaz 12 stundas skalo atšķaidīšanas ūdenī.

ATSAUCES

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 papildinājums

Melnā platgalvja sekundāro dzimumpazīmju novērtēšana noteiktu endokrīni aktīvu ķīmisko vielu detektēšanai

Pārskats

Testējot endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītājus, potenciāli svarīgas izskata pazīmes pieaugušiem melnajiem platgalvjiem ir ķermeņa krāsa (t. i., gaiša vai tumša), krāsojuma struktūra (t. i., ir vai nav vertikālas joslas), ķermeņa forma (t. i., galvas un krūšu daļas forma, vēdera apvidus uzpūšanās) un īpašas sekundārās dzimumpazīmes (t. i., nārsta kārpiņu skaits un lielums, pakauša segmenta un dējekļa lielums).

Nārsta kārpiņas reproduktīvi aktīviem melnā platgalvja tēviņiem atrodas uz galvas (uz pakauša segmenta) un parasti ir izkārtotas abpusēji simetriskā struktūrā *(Jensen et al. 2001)*. Kontrolgrupas mātītēm un jauniem tēviņiem un mātītēm kārpiņu attīstīšanās nav novērojama *(Jensen et al. 2001)*. Tēviņiem ap acīm un starp nāsīm var būt līdz astoņām atsevišķām kārpiņām. Vairums lielāko kārpiņu ir izkārtotas divās paralēlās līnijās tieši zem nāsīm un virs mutes. Daudzām zivīm kārpiņu grupas atrodas zem apakšžokļa; mutes tuvumā parasti atrodas viens kārpiņu pāris, tomēr tuvāk vēderam var atrasties līdz četrām kārpiņām. Reti ir vairāk nekā 30 kārpiņu (diapazons, 18–28; *Jensen et al. 2001*). Galvenās (skaita ziņā) kārpiņas ir atsevišķas, salīdzinoši apaļas struktūras, kuru augstums aptuveni līdzinās to rādiusam. Vairumam reproduktīvi aktīvo tēviņu ir arī vismaz dažas kārpiņas, kas ir tik palielinātas un izteiktas, ka nav atšķiramas kā atsevišķas struktūras.

Dažu endokrīnās sistēmas traucējumus izraisošu ķīmisko vielu ietekmē pretējā dzimuma īpatņiem var parādīties anormālas sekundārās dzimumpazīmes; piemēram, androgēna receptoru agonisti, piemēram, 17β-metiltestosterons vai 17β-trenbolons, var izraisīt nārsta kārpiņu veidošanos melnā platgalvja mātītēm *(Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003)*, bet estrogēna receptoru agonisti var samazināt tēviņu nārsta kārpiņu skaitu un lielumu *(Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000)*.

Turpinājumā sniegts melnā platgalvja nārsta kārpiņu apraksts, pamatojoties uz procedūrām, kuras izmanto ASV Vides aizsardzības aģentūras laboratorija Minesotas štata Dulutā (*U.S. Environmental Protection Agency lab in Duluth, MN*). Konkrētos izstrādājumus un/vai aprīkojumu var aizstāt ar līdzvērtīgiem pieejamiem materiāliem.

Aplūkošanu vislabāk veikt ar apgaismotu palielināmo stiklu vai apgaismotu mikroskopu ar 3X palielinājumu. Apskatiet zivi no aizmugures un no priekšpuses (ar galvu pret skatītāju).

a) Ievietojiet zivi mazā Petri platē (piemēram, ar 100 mm diametru), pavēršot to ar galvu pret skatītāju un ar vēderu uz leju. Fokusējiet skatu meklētāju, lai atrastu kārpiņas. Uzmanīgi un lēni apveliet zivi no viena sāna uz otru, lai noteiktu kārpiņu zonas. Saskaitiet kārpiņas un reģistrējiet to skaitu.

b) Atkārtojiet apskati uz galvas vēderpuses virsmas, Petri platē pavēršot zivi ar muguru pret skatītāju.

c) Katra zivs jāapskata 2 minūšu laikā.

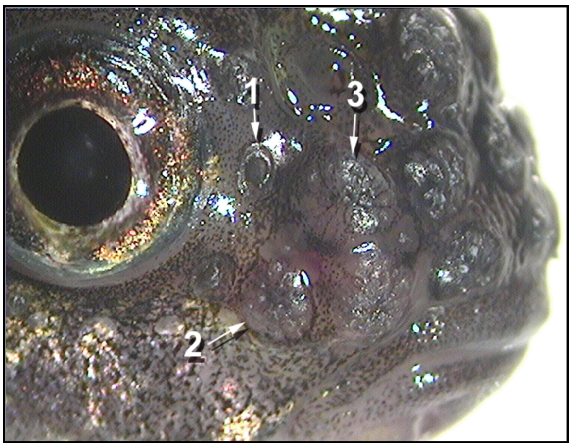
▼M6

Kārpiņu skaitīšana un novērtēšana

Melnajiem platgalvjiem ir identificētas sešas konkrētas zonas, kurās novērtē kārpiņu esamību un attīstīšanos. Ir sagatavota veidlapa, kurā var norādīt kārpiņu izvietojumu un daudzumu (sk. šī papildinājuma beigas). Kārpiņu skaitu reģistrē un to lielumu katram organismam kvantitatīvi novērtē atbilstoši šādai skalai: 0 – nav novērojama, 1 – ir novērojama, 2 – palielināta un 3 – izteikta (1. attēls).

0. kategorija – kārpiņas nav novērojamas. 1. kategorija – ir novērojamas; jebkura kārpiņa, kurai ir punkts, kurā tās augstums ir gandrīz vienāds ar rādiusu (diametru). 2 kategorija – palielināta; nosaka pēc audiem, kas izskatā atgādina zvaigznīti; parasti ar starveida pamatni un rievojumu no centrālās daļas. Kārpiņu augstums bieži vien ir nevienmērīgs, bet reizēm tās var būt apaļas. 3. kategorija – izteikta; parasti diezgan liela un noapaļota, ar mazāk izteiktu struktūru. Dažkārt šīs kārpiņas savienojas, izveidojot vienotu masu atsevišķā vai vairākās zonās (turpmāk norādītā B, C un D zona). Krāsojums un struktūra ir līdzīga 2. kategorijai, tomēr reizēm ar diezgan neskaidrām pazīmēm. Izmantojot šo kārpiņu novērtēšanas sistēmu, kopējais punktu skaits normālam kontrolgrupas tēviņam ar 18–20 kārpiņām parasti ir <50 (*Jensen et al. 2001*).

1. attēls



Dažām zivīm faktiskais kārpiņu skaits var pārsniegt veidnes rūtiņu skaitu (A papildinājums) attiecīgajai novērtējuma zonai. Šādā gadījumā papildu novērtējuma skaitļus var atzīmēt turpat pa labi vai pa kreisi no rūtiņas. Līdz ar to veidlapā nav jāatspoguļo simetrija. Papildu iespēja tādu kārpiņu kartēšanai, kas izvietotas pa pāriem vai vertikāli savienojušās gar mutes horizontālo plakni, ir divas reizes atzīmēt divu kārpiņu novērtējuma punktus vienā rūtiņā.

Kartēšanas zonas.

A – ap aci izvietotas kārpiņas. Kartē muguras-vēdera virzienā ap acs priekšējo gredzenu. Pieaugušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti vairākas, kontrolgrupas mātītēm nav, androgēniem eksponētām mātītēm parasti pāris (pa vienai pie katras acs) vai viena.

B – kārpiņas starp nāsīm (sensoro kanālu porām). Vairāk nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti pa pāriem (2 – palielināta vai 3 – izteikta). Kontrolgrupas mātītēm nav novērojamas, bet reizēm novērojamas un attīstās androgēniem eksponētām mātītēm.

C – kārpiņas, kas novietotas tieši nāšu priekšā, paralēli mutei. Nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti palielinātas vai izteiktas. Mazāk attīstītiem tēviņiem vai androgēniem eksponētām mātītēm novērojamas vai palielinātas.

▼M6

D – gar mutes līniju paralēli novietotas kārpiņas. Kontrolgrupas tēviņiem parasti tās vērtē kā attīstītas. Kontrolgrupas mātītēm to nav, bet androgēniem eksponētām mātītēm ir novērojamas.

E – kārpiņas uz apakšžokļa mutes tuvumā, parasti nelielas un pa pāriem. Mainīgā skaitā kontrolgrupas tēviņiem vai ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātiem tēviņiem un ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātām mātītēm.

F – kārpiņas izvietotas vēdera virzienā no E zonas. Parasti nelielas un pa pāriem. Novērojamas kontrolgrupas tēviņiem un androgēniem eksponētām mātītēm.

ATSAUCES

(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.

Kārpiņu uzskaites veidlapa

ID _____

Datums _____

Kopā punkti _____

Skaitliskais novērtējums

1-ir novērojama

2 – palielināta

3 – izteikta

	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 papildinājums

Japānas medakas sekundāro dzimumpazīmju novērtēšana noteiktu endokrīni aktīvu ķīmisko vielu detektēšanai

Turpinājumā sniegts Japānas medakas *(Oryzias latipes)* sekundāro dzimumpazīmju – kārpiņveida izaugumu (*) – mērījumu apraksts.

(*) Kārpiņveida izaugumi parasti ir novērojami tikai pieaugušiem tēviņiem, un tie atrodas uz anālās spuras no otrā līdz septītajam vai astotajam spuru staram, skaitot no anālās spuras aizmugurējā gala (1. un 2. attēls). Tomēr izaugumi nereti ir novērojami arī uz pirmā spuras stara no anālās spuras aizmugurējā gala. Šī standartoperāciju procedūra (turpmāk "SOP") attiecas arī uz kārpiņveida izaugumiem uz pirmā spuras stara (šajā SOP spuras stara kārtas skaitlis norāda staru secību no anālās spuras aizmugurējā gala).

(1) Pēc aknu izgriešanas (6. papildinājums) ķermeni ievieto koniskā centrifūgas stobriņā, kas satur 10 ml 10 % neitrāla formalīna buferšķīduma (augšpusē: galva, lejpusē: aste). Ja dzimumdziedzeris ir fiksēts šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums, ar nazi veic šķērsenisku griezienu starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri, raugoties, lai nebojātu ģenitālo poru un dzimumdziedzeri (3. attēls). Zivs ķermeņa priekšējo daļu ievieto fiksējošā šķīdumā, lai saglabātu dzimumdziedzeri, bet zivs astes daļu – 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, kā norādīts iepriekš.

(2) Kad zivs ķermenis ievietots 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, ar pinceti satver anālās spuras priekšējo daļu un aptuveni uz 30 sekundēm to saliec, lai anālā spura būtu atvērta. Anālo spuru ar pinceti uzmanīgi satver aiz dažiem priekšējās daļas stariem tā, lai nesaskrambātu kārpiņveida izaugumus.

(3) Pēc tam, kad anālā spura 30 sekundes ir turēta atplesta, zivs ķermeni līdz kārpiņveida izaugumu mērīšanai (jāmēra pēc vismaz 24 stundu fiksācijas) glabā istabas temperatūras 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.

Mērīšana

(1) Pēc tam, kad zivs ķermenis vismaz 24 stundas fiksēts 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, to no koniskā centrifūgas stobriņa izņem un ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieli) nosusina formalīnu.

(2) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Tad uzmanīgi ar mazām secēšanai paredzētām šķērēm nogriež anālo spuru (anālo spuru ieteicams nogriezt kopā ar nelielu pterigiofora daudzumu).

(3) Nogrieztās anālās spuras priekšējo daļu satver ar pinceti un noliek uz priekšmetstikliņa, uz kura ir daži pilieni ūdens. Pēc tam anālo spuru pārklāj ar segstikliņu. Anālo spuru ar pinceti satver saudzīgi, lai nesaskrambātu kārpiņveida izaugumus.

(4) Izmantojot skaitītāju zem bioloģiskā mikroskopa (stateniskā mikroskopa vai invertētā mikroskopa), saskaita spuras staru skrimšļa posmus ar kārpiņveida izaugumiem. Kārpiņveida izaugumus atzīst tad, ja nelieli izaugumi ir redzami uz spuras staru skrimšļa posmu aizmugurējās daļas. Darba lapā ieraksta kārtas skaitli spuras staram ar kārpiņveida izaugumu skaitu uz

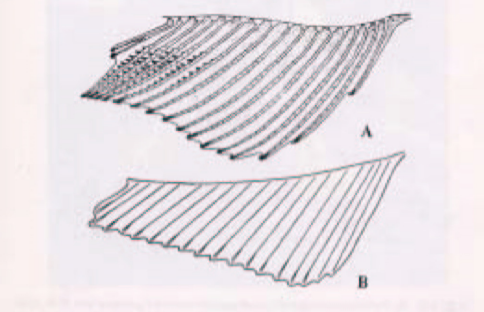
▼M6

skrimšļa posmiem (piemēram, pirmajā spuras starā: 0, otrajā spuras starā: 10, trešajā spuras starā: 12 utt.), un kopsummu katrai zivij norāda *Excel* izklājlapā. Ja nepieciešams, nofotografē anālo spuru un fotogrāfijā saskaita spuru staru skrimšļa posmos esošos kārpiņveida izaugumus.

(5) Pēc mērīšanas anālo spuru ievieto glabāšanai (1) punktā minētajā konusveida kolbā.

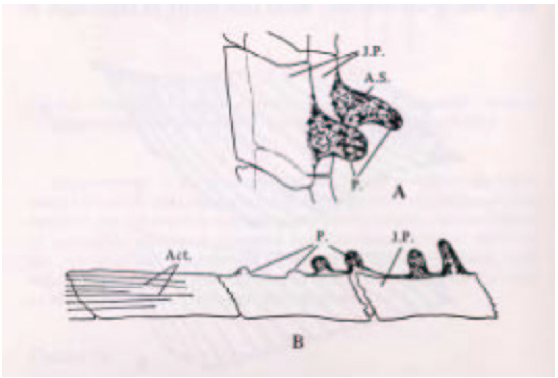
1. attēls.

Anālās spuras formas un lieluma atšķirības starp dzimumiem. A – tēviņa anālā spura; B – mātītes anālā spura. ***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.***



2. attēls.

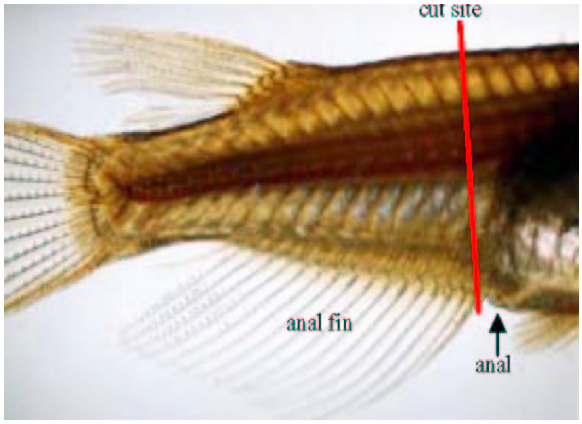
A – izaugumi uz anālās spuras staru skrimšļa posmiem; J.P., skrimšļa posmi; A.A. – attālums starp asīm; P. – izaugumi; B – anālās spuras distālais izvirzījums. Aktinotrihija šķiedras (Act.) atrodas spuras galā. ***Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.***



▼M6

3. attēls.

Zivs ķermeņa fotogrāfija, kurā redzama griezuma vieta gadījumā, kur dzimumdziedzeris ir fiksējošā šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums. Šajā gadījumā atlikušo ķermeņa daļu ar nazi nogriež starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri (sarkanā līnija), un zivs ķermeņa priekšdaļu ievieto dzimumdziedzerim paredzētajā fiksējošajā šķīdumā, bet zivs astes daļu ievieto 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.



▼M6

6. papildinājums

Ieteicamā paraugu ņemšanas kārtība vitelogenīna analīzei

Jāuzmanās, lai tēviņu un mātīšu *VTG* paraugi savstarpēji nekontaminētos.

1.A procedūra. Melnais platgalvis; asins paraugu ņemšana no astes vēnas/artērijas

Pēc anestezēšanas asti daļēji atdala ar skalpeļa asmeni un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārstobriņu no astes vēnas/artērijas ievāc asins paraugu. Pēc asins parauga paņemšanas plazmu ātri atdala, centrifugējot 3 minūtes ar paātrinājumu 15 000 g (vai 10 minūtes ar paātrinājumu 15 000 g 4 °C temperatūrā). Ja nepieciešams, pēc centrifugēšanas var noteikt hematokrīta procentuālo daudzumu. Plazmas daļu no mikrohematokrīta caurulītes izņem un glabā centrifūgas stobriņā ar 0,13 vienībām aprotinīna (proteāzes inhibitors) – 80 °C temperatūrā, līdz ir iespējama vitelogenīna noteikšana. Atkarībā no melnā platgalvja lieluma (atkarīgs no dzimuma) ievācamā asins parauga tilpums parasti ir 5 līdz 60 mikrolitri no zivs *(Jensen et al. 2001)*.

1.B procedūra. Melnais platgalvis; sirds asins paraugu ņemšana

Asins paraugus var ņemt arī ar sirds punkcijas metodi, izmantojot heparinizētu šļirci (1 000 heparīna vienības uz ml). Asinis ievieto Ependorfa mēģenēs (uz ledus) un centrifugē (5 minūtes, 7 000 g, istabas temperatūrā). Plazmu ievieto tīrās Ependorfa mēģenēs (ja ar plazmas daudzumu tas iespējams, alikvotās) un līdz analīzes veikšanai nekavējoties sasaldē – 80 °C temperatūrā *(Panter et al., 1998)*.

2.A procedūra. Japānas medaka; aknu izgriešana

Testa zivju izņemšana no testa kameras

(1) Testa zivi no testa kameras izņem ar nelielu sietiņkaroti. Jāraugās, lai testa zivis neiekristu citās testa kamerās.

(2) Testa zivis jāizņem šādā kārtībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgā gadījumā), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvās kontroles grupa. Turklāt no vienas testa kameras vispirms izņem visus tēviņus, tikai pēc tam izņem mātītes.

(3) Katras testa zivs dzimumu nosaka pēc ārējām sekundārām dzimumpazīmēm (piemēram, pēc anālās spuras formas).

(4) Testa zivi ievieto pārvietošanas traukā un pārnes uz darba vietu, kur notiek aknu izgriešana. Pēc marķējuma pārbauda, vai ir pareiza testēšanas kamera un pārvietošanas trauks, un pārliecinās, ka no testēšanas kameras izņemto zivju skaits un testēšanas kamerā palikušo zivju skaits ir attiecīgi.

(5) Ja dzimumu nav iespējams noteikt pēc zivju izskata, no testēšanas kameras izņem visas zivis. Šādā gadījumā dzimumu nosaka, ar stereoskopisko mikroskopu aplūkojot dzimumdziedzerus vai sekundārās dzimumpazīmes.

▼**M6**

Aknu izgriešana

(1) Testa zivis no pārvietošanas trauka ar nelielu sietiņkaroti ieceļ anestēzijas šķīdumā.

(2) Pēc testa zivju anestezēšanas tās ar pinceti (patēriņu preču tips) novieto uz filtrpapīra (vai uz papīra dvieļa). Testa zivi ar pinceti satver aiz galvas sāniem, lai nesalauztu asti.

(3) Ūdeni no testa zivs virsmas nosusina ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieli).

(4) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Pēc tam ar secēšanas šķērēm veic nelielu šķērsenisku iegriezumu pusceļā starp kakla vēderpuses daļu un vēdera vidusdaļu.

(5) Secēšanas šķēres ievieto nelielajā iegriezumā un pa vēdera viduslīniju uzšķērž vēderu no bronhu apvalka astes puses punkta līdz anālajai atverei galvaskausa pusē. Jāraugās, lai secēšanas šķēres neievietotu pārāk dziļi, bojājot aknas vai dzimumdziedzerus.

(6) Zem stereoskopiskā mikroskopa veic šādas darbības.

(7) Testa zivi ar vēderu uz augšu novieto uz papīra dvieļa (uz stikla Petri plates vai priekšmetstikliņa, ja tāds arī ir pieejams).

(8) Vēdera dobuma sienas papleš ar precīzijas pinceti un izņem iekšējos orgānus. Ja nepieciešams, iekšējos orgānus var izņemt, atdalot vienu no vēdera dobuma sienām.

(9) Ar vēl vienu precīzijas pincešu pāri vēdera dobumu paver tā, lai būtu redzamas aknu un žultspūšļa savienojuma vieta. Tad satver žultsceļu un nogriež žultspūsli. Jāuzmanās, lai žultspūslis nepārplīstu.

(10) Satver barības vadu un tādā pašā veidā no aknām atdala kuņģa un zarnu traktu. Jāraugās, lai neizlītu kuņģa un zarnu trakta saturs. Kuņģa un zarnu traktu astes pusē atdala no anālās atveres, un traktu izņem no vēdera dobuma.

(11) No aknām notīra taukus un citus audus. Jāraugās, lai aknas nesaskrambātu.

(12) Ar precīzijas pinceti satver aknu portālo zonu, un aknas izņem no vēdera dobuma.

(13) Aknas novieto uz priekšmetstikliņa. Ja nepieciešams, ar precīzijas pinceti no aknu virsmas noņem palikušos taukus un svešos audus (piemēram, vēderplēvi).

(14) Aknas ievieto 1,5 ml mikromēģenē, ko izmanto par taru, un ar elektroniskiem analītiskajiem svariem nosaka aknu svaru. Vērtību reģistrē darba lapā (nolasījuma precizitāte: 0,1 mg). Pārbauda identifikācijas informāciju uz mikromēģenes etiķetes.

(15) Mikromēģenei, kurā ir aknas, uzliek vāciņu. Mikromēģeni glabā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).

(16) Pēc vienu aknu izgriešanas secēšanas instrumentus notīra vai aizvieto ar tīriem instrumentiem.

▼M6

(17) Pēc šiem norādījumiem aknas izņem visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm.

(18) Kad visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm aknas ir izņemtas (t. i., no visiem tēviņiem vai mātītēm no testa kameras), visus aknu paraugus ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un noglabā saldētavā. Ja aknas drīz pēc izgriešanas nodod priekšapstrādei, paraugus uz nākamo darba vietu nogādā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).

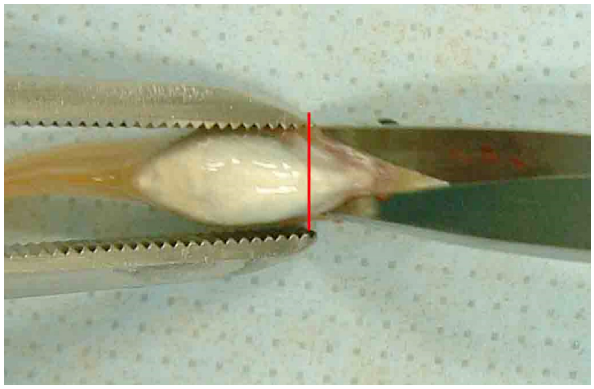
Pēc aknu izgriešanas zivs ķermeni var izmantot sekundāro dzimumpazīmju mērīšanai.

Paraugi

Ja testa zivju aknu paraugus drīz pēc izgriešanas nenodod priekšapstrādei, tos glabā ≤ – 70 °C temperatūrā.

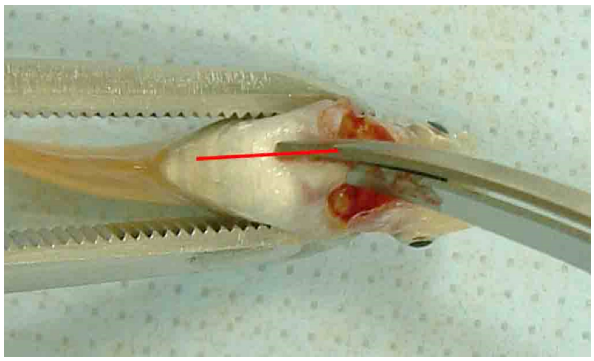
1. att.

Ar šķērēm izdara griezumu tieši pirms krūšuspurām.



2. att.

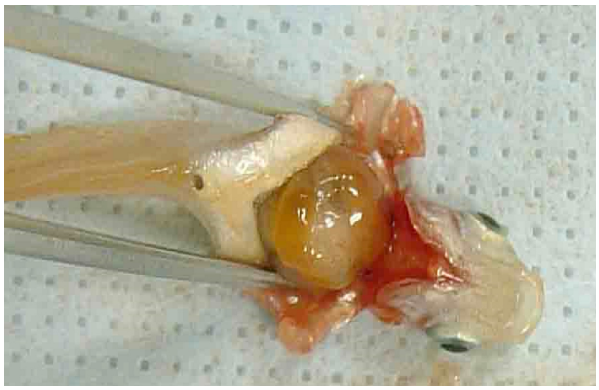
Ar šķērēm līdz punktam aptuveni 2 mm no anālās atveres galvas virzienā uzšķērž vēdera viduslīniju.



▼M6

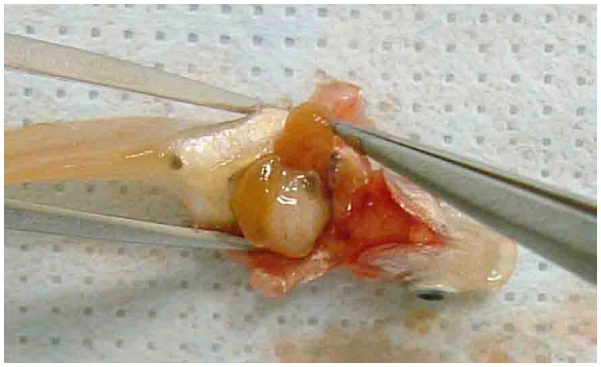
3. att.

Vēdera sienas papleš ar knaiblītēm, lai atsegtu aknas un citus iekšējos orgānus. (Vēdera sienas var ar sekcijas adatām atspraust uz sāniem.)



4. att.

Atdala un ar knaiblītēm izgriež aknas.



5. att.

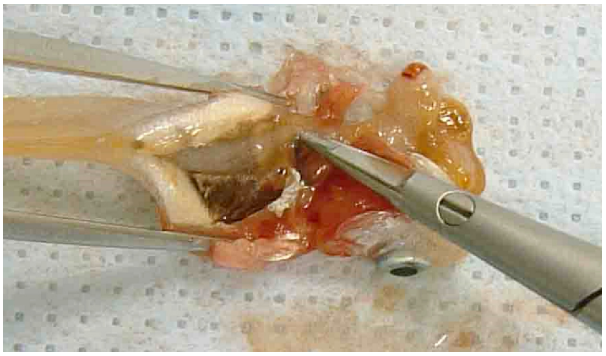
Ar knaiblītēm saudzīgi atvirza zarnas.



▼M6

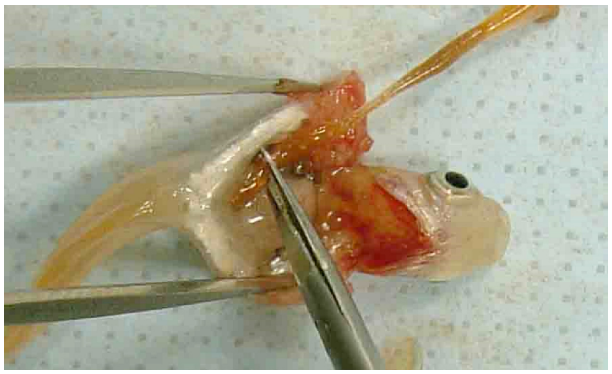
6. att.

Ar knaiblītēm atdala abus zarnu galus un jebkādas apzarņa daļas.



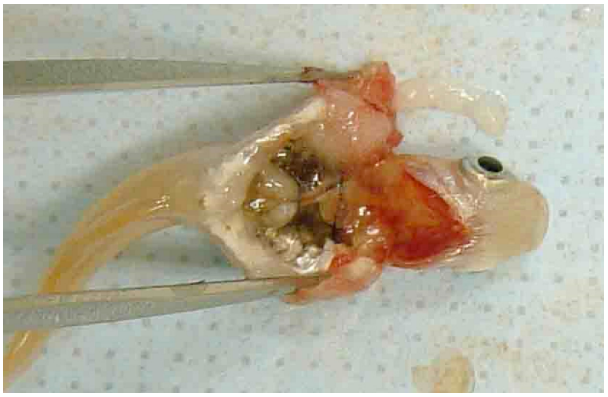
7. att. (mātīte)

Mātītēm veic identisku procedūru.



8. att.

Pabeigta procedūra.



2.B procedūra.Japānas medakas *(Oryzias latipes)* aknu priekšapstrāde vitelogenīna analīzes veikšanai.

No *ELISA* komplekta ņem homogenāta buferšķīduma pudelīti un to atdzesē sasmalcināta ledus šķīdumā (šķīduma temperatūra: ≤ 4 °C). Ja izmanto homogenāta buferšķīdumu no *EnBio ELISA* sistēmas, šķīdumu istabas temperatūrā atkausē, bet pēc tam pudelīti dzesē sadrumstalota ledus šķīdumā.

▼**M6**

Homogenāta buferšķīduma daudzumu aknām aprēķina, pamatojoties uz to svaru (uz 1 mg aknu svara pievieno 50 µl homogenāta buferšķīduma). Piemēram, aknām, kas sver 4,5 mg, nepieciešams 225 µl homogenāta buferšķīduma. Sagatavo homogenāta buferšķīduma tilpuma sarakstu visām aknām.

Aknu sagatavošana priekšapstrādei:

(1) 1,5 ml mikromēģeni ar aknu paraugu no saldētavas izņem tieši pirms priekšapstrādes;

(2) lai nepieļautu kontaminēšanos ar vitelogenīnu, tēviņu aknām priekšapstrādi veic, pirms apstrādā mātīšu aknas. Turklāt priekšapstrādi testa grupām veic šādā secībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgos gadījumos), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvā kontrolgrupa;

(3) no saldētavas noteiktā laikā izņemt drīkst tikai tādu skaitu 1,5 ml mikromēģeņu ar aknu paraugiem, cik šajā laikā var centrifugēt;

(4) 1,5 ml mikromēģenes ar aknu paraugiem pēc paraugu numuriem sakārto statīvā ar ledu (aknas nav jāatkausē).

Priekšapstrādes norise

1. Homogenizācijas buferšķīduma pievienošana:

(1) sarakstā pārbauda attiecīgajam aknu paraugam izmantojamo homogenāta buferšķīduma daudzumu un mikropipeti (daudzuma diapazons: 100–1 000 µl) pielāgo attiecīgajam daudzumam. Mikropipetei uzliek tīru uzgali;

(2) 1,5 ml mikromēģenē ar aknu paraugu no reaģenta pudelītes pievieno homogenāta buferšķīdumu;

(3) ievērojot iepriekš norādīto procedūru, homogenāta buferšķīdumu pievieno visās 1,5 ml mikromēģenēm ar aknu paraugiem. Mikropipetes uzgali nav nepieciešams aizstāt ar jaunu. Tomēr, ja uzgalis ir kontaminēts vai varētu tāds būt, tas jānomaina.

2. Aknu homogenizācija:

(1) mikromēģenes homogenizatoram pievieno jaunu homogenizācijas piestu;

(2) piestu ievieto 1,5 ml mikromēģenē. Mikromēģenes homogenizatoru tur tā, lai aknas piespiestu starp piestas virsmu un 1,5 ml mikromēģenes iekšējo sieniņu;

(3) mikromēģenes homogenizatoru darbina 10 līdz 20 sekundes. Procesa laikā 1,5 mikromēģeni dzesē ar sadrumstalotu ledu;

(4) piestu izceļ no 1,5 ml mikromēģenes un nogaida aptuveni 10 sekundes. Pēc tam suspensiju pārbauda vizuāli;

(5) ja suspensija ir novērojami aknu gabaliņi, (3) un (4) darbību atkārto, līdz ir sagatavots pieņemams aknu homogenāts;

▼**M6**

(6) aknu homogenāta suspensiju līdz centrifugēšanai dzesē statīvā ar ledu;

(7) pēc katra homogenāta sagatavošanas piestu aizstāj ar jaunu;

(8) visas aknas homogenizē ar homogenāta buferšķīdumu, ievērojot iepriekš norādīto procedūru.

3. Aknu homogenāta suspensijas centrifugēšana:

(1) pārliecinās, ka atdzesētajā centrifūgas kamerā temperatūra ir ≤ 5 °C;

(2) 1,5 ml mikromēģenes ar aknu homogenāta suspensiju ievieto atdzesētā centrifūgā (ja, nepieciešams, noregulē līdzsvaru);

(3) aknu homogenāta suspensiju 10 min. centrifugē ar 13 000 g ≤ 5 °C temperatūrā. Tomēr, ja centrifugāti ir pietiekami atdalīti, centrifugēšanas spēku un laiku var regulēt pēc vajadzības;

(4) pēc centrifugēšanas pārliecinās, ka centrifugāti ir pietiekami atdalīti (virsslānis: lipīdi, vidējais slānis: centrifugāta šķīdums, apakšslānis: aknu audi). Ja atdalīšana nav pietiekama, suspensiju centrifugē vēlreiz, ievērojot tos pašus nosacījumus;

(5) visus paraugus izņem no atdzesētās centrifūgas un paraugu numuru secībā sakārto statīvā ar ledu. Jāraugās, lai atdalītie slāņi pēc centrifugēšanas atkal nesuspendētos.

4. Centrifugātu ievākšana:

(1) četras centrifugāta glabāšanai paredzētās 0,5 ml mikromēģenes ievieto mēģeņu statīvā;

(2) ar mikropipeti ievāc 30 µl katra centrifugāta (atdalīts kā atsevišķs slānis) un ievada vienā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa;

(3) tādā pašā veidā centrifugātu ievāc un ievada citās divās 0,5 ml mikromēģenēs;

(4) ar mikropipeti ievāc atlikušo centrifugātu (ja iespējams: ≥ 100 µl). Pēc tam centrifugātu ievada ceturtajā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa;

(5) 0,5 ml mikromēģeni aizdara ar vāciņu un uz etiķetes norāda centrifugāta daudzumu. Pēc tam mikromēģenes nekavējoties atdzesē statīvā ar ledu;

(6) katra centrifugāta ievākšanai mikropipetes uzgali aizstāj ar jaunu. Ja uzgalim pielīp liels daudzums lipīdu, uzgali nekavējoties aizstāj ar jaunu, lai nepieļautu aknu ekstrakta piesārņošanos ar taukiem;

(7) saskaņā ar iepriekš aprakstīto procedūru visu centrifugēto centrifugātu ievada četrās 0,5 ml mikromēģenēs;

▼M6

(8) pēc centrifugāta ievadīšanas 0,5 ml mikromēģenēs tās ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un nekavējoties sasaldē saldētavā. Ja *VTG* koncentrācijas mēra tūlīt pēc priekšapstrādes, vienu 0,5 ml mikromēģeni (ar 30 µl centrifugāta) atstāj dzesēties mēģeņu statīvā un nogādā darba vietā, kurā veic *ELISA* testu. Šādā gadījumā pārējās mikromēģenes ievieto mēģeņu statīvos un sasaldē saldētavā;

(9) pēc centrifugāta ievākšanas atlikumu atbilstīgi likvidē.

Paraugu glabāšana

Aknu homogenāta centrifugātu saturošās 0,5 ml mikromēģenes līdz izmantošanai *ELISA* glabā ≤ – 70 °C temperatūrā.

3.A procedūra. Zebrzivs; asins paraugu ņemšana no astes vēnas/artērijas

Uzreiz pēc anestezēšanas asti šķērseniski atdala un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārcaurulīti no astes artērijas/vēnas izvada asinis. Asins daudzums atkarībā no zivs lieluma var būt 5 līdz 15 µl. Mikrokapilāra caurulītē pievieno tādu pašu tilpumu aprotinīna buferšķīduma (6 µgml fosfāta fizioloģiskajā buferšķīdumā (*PBS*)) un centrifugējot atdala plazmu no asinīm (5 minūtes pie 600 g). Plazmu ievāc testa mēģenēs un līdz vitelogenīna vai citu interesējošo proteīnu analizēšanai glabā – 20 °C temperatūrā.

3.B procedūra. Zebrzivs; asins paraugu ņemšana ar sirds punkciju

Lai nepieļautu asins koagulāciju un proteīnu noārdīšanos, paraugus ievāc fosfāta fizioloģiskajā buferšķīdumā (*PBS*), kas satur heparīnu (1 000 vienības/ml) un proteāzes inhibitoru aprotinīnu (2 TIU/ml). Ieteicamās buferšķīduma sastāvdaļas ir heparīna amonija sāls un liofilizētais aprotinīns. Asins paraugu ņemšanai ieteicams izmantot šļirci (1 ml) ar fiksētu smalku adatu (piemēram, *Braun Omnikan-F*). Šļircē iepriekš iepilda buferšķīdumu (aptuveni 100 µl), lai no katras zivs pilnībā eluētu mazus asins daudzumus. Asins paraugus ņem, izmantojot sirds punkciju. Vispirms zivi anestezē ar MS-222 (100 mg/l). Pareizā anestēzijas līmenī iespējams atšķirt zebrzivs sirdsdarbības fāzes. Veicot sirds punkciju, uz šļirces virzuli izdara nelielu spiedienu. Asins parauga lielums var būt 20–40 mikrolitru. Pēc sirds punkcijas asins un buferšķīduma maisījums jāiepilda testa mēģenē. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot (20 min; 5 000 g) un līdz nepieciešamo analīžu veikšanai glabā – 80 °C.

3.C procedūra. SOP: zebrzivs; galvas un astes homogenizācija

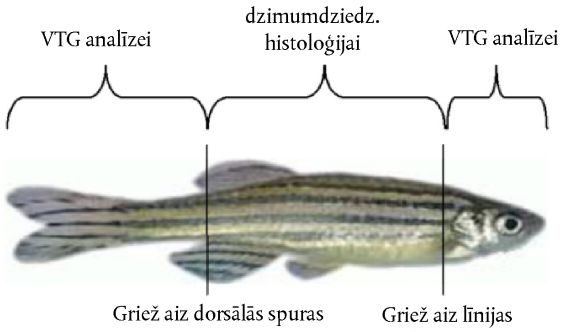
(1) Zivis anestezē un eitanazē atbilstoši testēšanas procedūrai.

(2) Zivīm atbilstoši 1. attēlam nogriež galvu un asti.

Svarīgi. Pirms katras nākamās zivs apstrādes visi sadalīšanas instrumenti un griešanas paliktnis pienācīgi jānoskalo un jānotīra (piemēram, ar 96 % etanolu), lai neeksponētu tēviņu organismus "nepiesārņotu ar vitelogenīnu" no mātītēm vai ķīmiskajai vielai eksponētiem tēviņiem.

▼**M6**

1. attēls



(3) Katras zivs galvas un astes svaru nosaka, noapaļojot līdz tuvākajam mg.

(4) Pēc nosvēršanas zivs daļas ievieto attiecīgās mēģenēs (piemēram, 1,5 mg Ependorfa mēģenēs) un līdz homogenizēšanai sasaldē – 80 °C temperatūrā vai tieši homogenizē uz ledus ar diviem plastmasas irbuļiem. (Ja vien darbības veic uz ledus un tiek iegūta viendabīga masa, var izmantot arī citas metodes.) Svarīga piezīme: mēģenes pienācīgi numurē, lai zivs galva un aste būtu sasaistāma ar attiecīgo ķermeņa daļu, ko izmanto dzimumdziedzeru histoloģijai.

(5) Pēc viendabīgas masas iegūšanas pievieno ledus temperatūras homogenizācijas buferšķīdumu (*), kura svars 4 reizes pārsniedz audu svaru. Turpina darboties ar irbuļiem, līdz iegūst viendabīgu maisījumu. Svarīga piezīme: katrai zivij izmanto jaunus irbuļus.

(6) Līdz 30 min centrifugēšanai 4 °C temperatūrā pie 50 000 × g paraugus novieto uz ledus.

(7) Ar pipeti vismaz divās mēģenēs katrā iepilda 20 µl centrifugāta, pipetes uzgali ievietojot zem virspusē esošā tauku slāņa un rūpīgi iesūcot centrifugātu bez tauku vai plāksnīšu daļiņām.

(8) Līdz izmantošanai mēģenes glabā – 80 °C temperatūrā.

(*) **Homogenizācijas buferšķīdums:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteāzes inhibitora maisījums (*Sigma*)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteāzes inhibitora maisījums.

— T*RIS*: *TRIS-ULTRA PURE* (*ICN*), piemēram, no *Bie & Berntsen*, Dānija.

— Proteāzes inhibitora maisījums: no *Sigma* (zīdītāju audiem); produkta numurs P 8340.

— *Piezīme.* Homogenizācijas buferšķīdums jāizmanto ražošanas dienā. Izmantošanas laikā to novieto uz ledus.

▼**M6**

7. papildinājums

Stiprināti vitelogenīna paraugi un vairākiem testiem kopīga references standartviela

Katrā dienā, kad veic vitelogenīna testus, analizē stiprinātu paraugu, kas pagatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu. Testiem kopīgās references standartvielas pagatavošanai izmantotais vitelogenīns nedrīkst būt no tās partijas, ko izmanto veicamā testa kalibrācijas etalonu sagatavošanā.

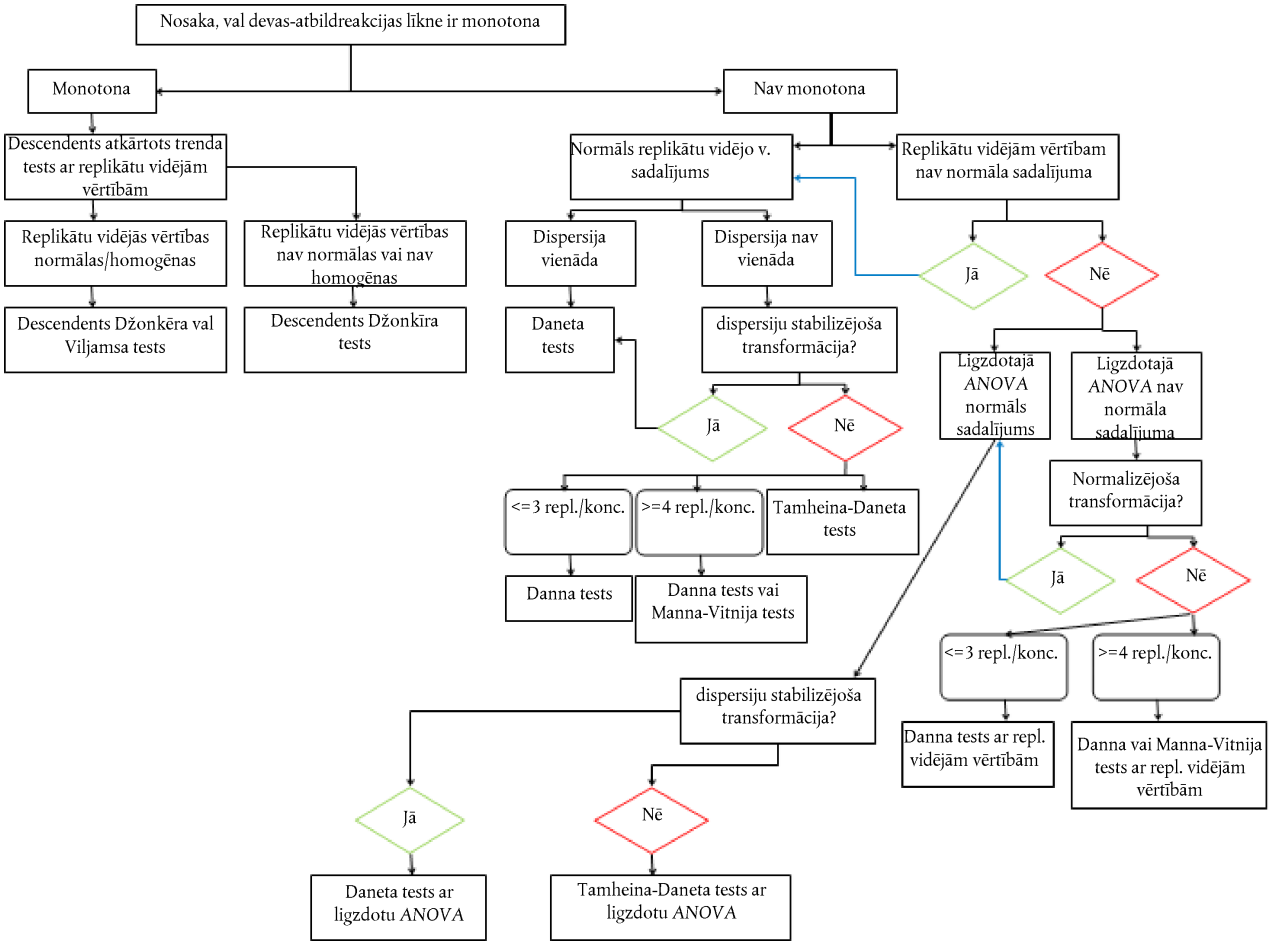
Stiprināto paraugu sagatavo, kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugam zināmā daudzumā pievienojot testiem kopīgo references standartvielu. Paraugu stiprina, lai vitelogenīna koncentrācija būtu 10 un 100 reizes lielāka nekā paredzamā vitelogenīna koncentrācija kontrolgrupas zivs tēviņa organismā. Kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugs, kuru stiprina, var būt no vienas zivs vai no vairākām zivīm.

Vismaz divās dublikātiedobēs analizē apakšparaugu ar nestiprinātu kontrolgrupas tēviņa plazmu. Vismaz divās dublikātiedobēs analizē arī stiprināto paraugu. Lai noteiktu sagaidāmo koncentrāciju, vitelogenīna vidējo daudzumu abos nestiprinātajos kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugos pieskaita aprēķinātajam vitelogenīna daudzumam, kas pievienots paraugu stiprināšanai. Šo sagaidāmās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testa rezultātiem norāda testēšanas ziņojumā.

▼M6

8. papildinājums

Lēmumu diagramma statistiskajā analīzē



02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. ABINIEKU METAMORFOZES TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 231 (2009. gads). Tā kā pastāv bažas, ka vidē esošās ķīmiskās vielas var negatīvi ietekmēt cilvēkus un savvaļas sugas, ir nepieciešams izstrādāt un apstiprināt testu vairogdziedzera darbību ietekmējošo ķīmisko vielu noteikšanai mugurkaulnieku sugām. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos un izstrādātu jaunus testēšanas norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu. Viens no minētās rīcības elementiem bija izveidot testēšanas norādījumus, kas ļautu noteikt ķīmiskās vielas, kuras ietekmē mugurkaulnieku sugu vairogdziedzera darbību. Tika ierosināts atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījuma ar grauzējiem uzlabojums (šā pielikuma B.7. nodaļa) un abinieku metamorfozes tests (AMT). Tika apstiprināta uzlabotā testēšanas metode B.7 un izdota pārskatītā testēšanas metode. Abinieku metamorfozes testam (AMT) veica vērienīgu validācijas programmu, kurā ietilpa pētījumi laboratorijā un starp laboratorijām, kas parādīja testa atbilstību un ticamību (1, 2). Pēc tam neatkarīga ekspertu grupa ar salīdzinošās izvērtēšanas palīdzību veica testa validāciju (3). Šī testēšanas metode izstrādāta, ņemot vērā pieredzi, kas gūta vairogdziedzera darbību ietekmējošo ķīmisko vielu noteikšanas testu validācijas pētījumos un darbā, kas īstenots vairākās ESAO dalībvalstīs.

TESTA PRINCIPS

2. Abinieku metamorfozes tests (AMT) ir skrīninga tests, kas paredzēts, lai empīriski identificētu ķīmiskās vielas, kuras var traucēt normālu hipotalāma-hipofīzes-vairogdziedzera (HHV) ass sistēmas darbību. AMT atbilst vispārīgam mugurkaulnieku modelim tādā ziņā, ka tas attiecas uz HHV ass sistēmas saglabātajām struktūrām un funkcijām. Tests ir nozīmīgs, jo abinieku metamorfoze nodrošina labi izpētītu, no vairogdziedzera darbības atkarīgu procesu, kas atbild uz HHV ass sistēmā aktīvām ķīmiskajām vielām, un šis ir vienīgais esošais tests, ar ko nosaka vairogdziedzera aktivitāti dzīvniekam morfoloģiskās attīstības laikā.

3. Standarta eksperimenta plāns paredz veikt testu ar gludās piešvardes *(Xenopus laevis)* 51. attīstības stadijas kurkuļiem, ko 21 dienu eksponē vismaz trijām dažādām testējamās vielas koncentrācijām, kā arī – kontroles nolūkā – atšķaidīšanas ūdenim. Katrai testa apstrādei ir četri replikāti. Testa sākumā visām apstrādes grupām katrā testēšanas tvertnē atrodas 20 kurkuļi. Novērojamie beigupunkti ir pakaļējās ekstremitātes garums, garums no purna (galvas priekšdaļas) līdz kloākai *(SVL – snout to vent lenght)*, attīstības stadija, mitrais svars, vairogdziedzera histoloģija un mirstības novērojumi katru dienu.

METODES APRAKSTS

Testa sugas

4. Gludā piešvarde (*Xenopus laevis*) ir visā pasaulē bieži laboratorijās kultivēta suga, kas viegli iegūstama no komerciālajiem piegādātājiem. Izmantojot cilvēka horiona gonadotropīna *(hCG)* injekcijas, šai sugai visa gada garumā ir viegli ierosināma vairošanās, un iegūtie kurkuļi ir lielā skaitā

▼M6

viegli izaudzējami līdz izvēlētajām attīstības stadijām, ļaujot izmantot attīstības stadijām specifiskus testēšanas protokolus. Testā vēlams izmantot turpat uz vietas no pieaugušiem īpatņiem iegūtus kurkuļus. Mazāk ieteicama alternatīva ir ikru un embriju nosūtīšana uz testēšanas laboratoriju, kurā tiek veikta aklimatizācija; nav pieļaujama testā izmantojamās stadijas kurkuļu piegāde.

Iekārtas un aprīkojums

5. Testa veikšanai nepieciešamas šādas iekārtas un aprīkojums:

a) ekspozīcijas sistēma (sk. aprakstu turpmāk);

b) stikla vai nerūsējošā tērauda akvāriji (sk. aprakstu turpmāk);

c) audzēšanas tvertnes;

d) temperatūras regulēšanas aprīkojums (piem., sildītāji vai dzesētāji (noregulējami uz 22° ± 1 °C));

e) termometrs;

f) binokulārais preparēšanas mikroskops;

g) digitālā kamera ar vismaz 4 megapikseļu izšķirtspēju un makrorežīmu;

h) attēlu digitalizēšanas programmatūra;

i) Petri plate (piem., 100 × 15 mm) vai līdzīga izmēra caurspīdīga plastmasas kamera;

j) analītiskie svari, ar kuriem iespējams veikt mērījumus līdz trīs zīmēm aiz komata (mg);

k) ūdenī izšķīdušā skābekļa mērītājs;

l) pH metrs;

m) gaismas intensitātes mērītājs, kas rezultātus uzrāda luksos;

n) dažādi laboratorijas trauki un piederumi;

o) regulējamās pipetes (10–5 000 µl) vai atbilstošu lielumu pipešu komplekts;

p) testējamā ķīmiskā viela testa veikšanai pietiekamā daudzumā, vēlams no vienas partijas;

q) testējamās ķīmiskās vielas noteikšanai piemērota analītiskā aparatūra vai arī analīžu pakalpojumu sniedzējs, ar ko noslēgts līgums.

Testēšanas iespējas un ierobežojumi

6. Abinieku metamorfozes tests (AMT) balstās uz ekspozīcijas ūdens vidē protokolu, saskaņā ar kuru testējamo ķīmisko vielu ievada testa kamerās ar caurplūdes sistēmas palīdzību. Tomēr caurplūdes metodēm ir ierobežojumi attiecībā uz to, kādas ķīmiskās vielas var tikt testētas atkarībā no to fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādēļ pirms šā protokola izmantošanas jāiegūst pamata informācija par ķīmiskās vielas piemērotību testēšanai, kā arī jāvadās pēc ESAO Norādījumu dokumenta par sarežģītu vielu un maisījumu toksicitātes ūdenī testēšanu (4). Parametri, kas norāda, ka

▼M6

ķīmiskā viela varētu būt grūti testējama ūdens sistēmās, ietver augstu oktanola-ūdens sadalījuma koeficientu (log K_{ow}), lielu gaistamību, uzņēmību pret hidrolīzi un uzņēmību pret fotolīzi parastajos laboratorijas apgaismojuma apstākļos. Testējamību var ietekmēt arī citi faktori, kurus katrā gadījumā jānosaka atsevišķi. Ja ķīmisko vielu nav iespējams veiksmīgi izmantot testā ar caurplūdes sistēmas palīdzību, var izmantot statisku sistēmu ar periodisku ūdens nomaiņu. Ja neviena no šīm sistēmām nav pieskaņojama testējamajai ķīmiskajai vielai, pamatnostādne ir netestēt to ar šo protokolu.

Ekspozīcijas sistēma

7. Caurplūdes atšķaidīšanas sistēmai, ja iespējams, dodama priekšroka salīdzinājumā ar statisku sistēmu ar periodisku ūdens nomaiņu. Ja kādas testējamās ķīmiskās vielas kāda fizikālā un/vai ķīmiskā īpašība nav piemērota caurplūdes atšķaidīšanas sistēmai, var izmantot alternatīvu ekspozīcijas sistēmu (piem., periodiski atjauninātu statisko sistēmu). Sistēmā jābūt ūdens saskares komponentiem: stiklam, nerūsējošajam tēraudam un/vai politetrafluoretilēnam. Taču drīkst izmantot arī piemērotus plastmasas materiālus, ja tie nekompromitē pētījumu. Ekspozīcijas tvertnēm jābūt stikla vai nerūsējošā tērauda akvārijiem, kas aprīkoti ar spiediencauruli; aptuvenais tvertnes tilpums ir 4,0–10,0 litri, minimālais ūdens dziļums ir 10–15 cm. Sistēmai jāspēj uzturēt visas ekspozīcijas koncentrācijas un kontrolgrupa, ar četriem replikātiem katrā apstrādē. Plūsmas ātrumam katrā tvertnē jābūt nemainīgam un piemērotam, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ķīmisko vielu ekspozīciju (piem., 25 ml/min). Apstrādes tvertnes jāizkārto ekspozīcijas sistēmā tā, lai mazinātu iespējamo novietojuma ietekmi, piem., nelielas temperatūras, gaismas intensitātes u.tml. atšķirības. Lai nodrošinātu 12 stundu gaismas:12 stundu tumsas fotoperiodu, jāizmanto fluorescējošs apgaismojums; apgaismojuma intensitāte ir diapazonā 600–2 000 luksi (lūmeni uz kvadrātmetru) pie ūdens virsmas. Katrā testēšanas tvertnē jāuztur ūdens temperatūra 22° ± 1 °C, pH 6,5–8,5, un izšķīdušā skābekļa koncentrācija > 3,5 mg/l (> 40 % gaisa piesātinājuma). Reizi nedēļā jāmēra vismaz ūdens temperatūra, pH un izšķīdušais skābeklis; temperatūru ieteicams mērīt nepārtraukti vismaz vienā testēšanas traukā. Apstākļi, kādos īsteno testa protokolu, aprakstīti 1. papildinājumā. Papildu informācija par caurplūdes ekspozīcijas sistēmu un/vai statisku sistēmu ar periodisku ūdens nomaiņu izveidi pieejama *ASTM* Standarta norādījumos par akūtās toksicitātes testu veikšanu ar testa materiāliem ar zivīm, lielajiem bezmugurkaulniekiem un abiniekiem (5), kā arī sk. vispārējos ūdens toksicitātes testus.

Ūdens kvalitāte

8. Izmantojams jebkurš uz vietas pieejams ūdens (piem., avota ūdens vai ar aktivētās ogles filtru attīrīts krāna ūdens), ja tajā ir iespējama normāla *X. laevis* kurkuļu augšana un attīstība. Tā kā vietējā ūdens kvalitāte dažādās teritorijās var būtiski atšķirties, ir jāveic ūdens analīzes, jo īpaši, ja nav pieejami vēsturiski dati par ūdens izmantojamību *Xenopus* audzēšanā. Īpaša uzmanība jāpievērš tam, lai ūdenī nav vara, hlora un hloramīnu,

▼M6

kas ir toksiski vardēm un kurkuļiem. Pēc tam vēlams analizēt arī fluorīda, perhlorāta un hlorāta (dzeramā ūdens dezinfekcijas blakusproduktu) fona līmeni ūdenī, jo visi šie anjoni ir vairogdziedzera joda transportētāja substrāti, un paaugstināts kāda no šiem anjoniem līmenis var ietekmēt pētījuma rezultātu. Analīzes jāveic pirms testa sākuma, un testēšanas ūdenim parasti jābūt brīvam no šiem anjoniem.

Joda koncentrācija testēšanas ūdenī

9. Lai vairogdziedzeris varētu sintezēt vairogdziedzera hormonu *(TH)*, kurkuļiem jābūt pieejamam pietiekamam joda daudzumam, ko uzņem gan ar ūdeni, gan barību. Pagaidām nav pieejamas empīriski izstrādātas minimālās joda koncentrācijas vadlīnijas. Taču joda pieejamība var ietekmēt endokrīnās sistēmas spēju reaģēt uz vairogdziedzera darbību ietekmējošajām vielām, un ir zināms, ka tā var mainīt vairogdziedzera pamataktivitāti, tādēļ, interpretējot vairogdziedzera histopatoloģijas rezultātus, jāpievērš uzmanība šim aspektam. Tāpēc ziņojumā jāiekļauj izmērītās joda koncentrācijas testēšanas ūdenī. Pamatojoties uz datiem, kas pieejami no validēšanas pētījumiem, šis protokols ir labi īstenojams apstākļos, kad testēšanas ūdens joda (I^-) koncentrācijas ir diapazonā 0,5–10 µg/l. Ideālā gadījumā minimālā joda koncentrācija testēšanas ūdenī ir 0,5 µg/l. Ja testēšanas ūdens ir pagatavots no dejonizēta ūdens, tam pievieno jodu minimālajā koncentrācijā 0,5 µg/l. Ja testēšanas ūdenim vēl papildus ir pievienots jods vai citi sāļi, tas noteikti jānorāda ziņojumā.

Dzīvnieku turēšana

Pieaugušo dzīvnieku kopšana un audzēšana

10. Pieaugušo dzīvnieku kopšana un audzēšana notiek saskaņā ar standarta vadlīnijām, par kurām sīkāku informāciju var iegūt standarta norādījumos varžu embriju teratoģenēzes testa veikšanai *(FETAX)* (6). Šādas standarta vadlīnijas sniedz pienācīgas turēšanas un audzēšanas metožu piemērus, bet strikta to ievērošana netiek prasīta. Lai ierosinātu vairošanos, pieaugušu tēviņu un mātīšu pāriem (3–5) injicē cilvēka horiona gonadotropīnu *(hCG)*. Mātītēm un tēviņiem injicē attiecīgi aptuveni 800 IU–1 000 IU un 600 IU–800 IU *hCG*, kas izšķīdināts 0,6–0,9 % sāls šķīdumā. Vaislas pārus tur lielās tvertnēs, kurās ir netraucēti un statiski apstākļi, lai veicinātu nārstu. Vairošanās tvertnēm jābūt ar nerūsējošā tērauda vai plastmasas sieta dubultdibenu, kas iznērstajiem ikriem ļauj uzkrāties tvertnes apakšā. Vardes, kas saņēmušas injekciju vēlā pēcpusdienā, parasti iznērš lielāko daļu ikru nākamās dienas priekšpusdienā. Kad iznērsts un apaugļots pietiekams daudzums ikru, pieaugušos dzīvniekus izņem no vairošanās tvertnēm.

Kurkuļu kopšana un atlase

11. Pēc tam, kad pieaugušos dzīvniekus izņem no vairošanās tvertnēm, ikrus savāc un novērtē to dzīvotspēju, izmantojot reprezentatīvu embriju apakšgrupu no visām vairošanās tvertnēm. Pamatojoties uz embriju dzīvotspēju un pietiekamu embriju skaitu (vismaz 1 500), jāsaglabā labākais(-ie) individuālais(-ie) nārsts(-i) (ieteicams 2–3, lai izvērtētu iznērsto ikru kvalitāti). Visiem pētījumā izmantotajiem organismiem jānāk no viena un tā paša nārsta (proti, nārstus nedrīkst sajaukt). Embrijus pārnes lielā platē vai šķīvī, un visus acīmredzami nedzīvus vai anomālus ikrus (sk. definīciju (5)) ar pipeti izņem. Veselīgos embrijus no katra no trim nārstiem ievieto trīs atsevišķās izšķilšanās tvertnēs. Pamatojoties uz dzīvotspējas un inkubācijas sekmēm, četras dienas pēc ievietošanas izšķilšanās tvertnēs izvēlas labāko

▼M6

nārstu, un kurkuļus pārvieto uz atbilstoša skaita audzēšanas tvertnēm, kurās uztur 22° ± 1 °C. Turklāt atsevišķās tvertnēs ievieto dažus papildu kurkuļus, kurus izmanto, lai aizstātu audzēšanas tvertnēs pirmajā nedēļā mirušos īpatņus. Šī procedūra uztur nemainīgu organismu blīvumu un tādējādi samazina attīstības atšķirības viena nārsta kohortā. Visas audzēšanas tvertnes katru dienu jātīra ar sifonu. Piesardzības dēļ vinila vai nitrila cimdi ir ieteicamāki nekā lateksa cimdi. Pirmajā nedēļā katru dienu ir jāizņem mirušie īpatņi un jāaizstāj ar rezerves kurkuļiem, lai saglabātu organismu blīvumu. Barošanai jānotiek vismaz divas reizes dienā.

12. Pirmsekspozīcijas fāzē kurkuļus aklimatizē ekspozīcijas fāzes faktiskajiem apstākļiem, ieskaitot barību, temperatūru, gaismas-tumsas ciklu un kultivēšanas barotni. Tādēļ pirmsekspozīcijas un ekspozīcijas fāzē ir ieteicams lietot vienu un to pašu kultivēšanas/atšķaidīšanas ūdeni. Ja kurkuļu uzturēšanai pirmsekspozīcijas fāzē lieto statisku kultūras sistēmu, kultivēšanas barotne ir pilnībā jānomaina vismaz divas reizes nedēļā. Pirmsekspozīcijas periodā nedrīkst pieļaut pārāk lielu kurkuļu blīvumu, jo tas var būtiski ietekmēt kurkuļu attīstību gaidāmajā testēšanas periodā. Tādēļ īpatņu blīvums audzēšanas traukā nedrīkstētu pārsniegt apmēram četrus kurkuļus uz kultivēšanas barotnes litru (statiskā ekspozīcijas sistēma) vai 10 kurkuļus uz kultivēšanas barotnes litru (izmantojot, piem., 50 ml/min plūsmu pirmsekspozīcijas jeb kultivēšanas sistēmā). Šādos apstākļos kurkuļiem 12 dienu laikā būtu jāattīstās no 45./46. stadijas līdz 51. attīstības stadijai. Reprezentatīviem pamatgrupas kurkuļiem katru dienu pārbauda attīstības stadiju, lai noteiktu, kurā laikā jāsāk ekspozīcija. Kopšana jāveic tā, lai neradītu traumas un stresu kurkuļiem, jo īpaši tos pārvietojot, tīrot akvārijus un veicot manipulācijas ar tiem. Jācenšas izvairīties no tādiem stresu izraisošiem apstākļiem/darbībām kā skaļš un/vai nepārtraukts troksnis, klaudzināšana pa akvārijiem, vibrācijas akvārijos, pārmērīga aktivitāte laboratorijā, straujas vides apstākļu maiņas (gaismas pieejamība, temperatūra, pH, izšķīdušais skābeklis, ūdens plūsmas ātrums u. c.). Ja 17 dienās pēc apaugļošanas kurkuļi nesasniedz 51. attīstības stadiju, par potenciālu iemeslu ir uzskatāms stress.

Kurkuļu kultivēšana un barošana

13. Pirmsekspozīcijas laikā (pēc Nivkopa un Fābera 45./46. attīstības stadija (8)) un visā 21 dienu ilgajā testa laikā kurkuļus baro, piem., ar komerciālo kurkuļu barību, ko izmantoja validēšanas pētījumos (sk. arī 1. papildinājumu), vai arī ar citu barību, kas ļauj līdzvērtīgi īstenot abinieku metamorfozes testu. Pirmsekspozīcijas laikā barošanas režīms rūpīgi jāpielāgo augošo kurkuļu vajadzībām. Nesen izšķīlušies kurkuļiem barība jādod nelielās porcijās vairākas (vismaz divas) reizes dienā. Jāizvairās no pārāk liela barības daudzuma, lai *i)* saglabātu ūdens kvalitāti un *ii)* novērstu žaunu spraugu aizsprostošanos ar barības daļiņām un detrītu. Attiecībā uz validēšanas pētījumos izmantoto kurkuļu barību, ikdienas barības deva ir jāpalielina atbilstoši kurkuļu augšanai, īsi pirms testa sākuma sasniedzot apmēram 30 mg uz dzīvnieku dienā. Validēšanas pētījumos ir

▼M6

pierādīts, ka komerciālā barība nodrošina *X. laevis* kurkuļu normālu augšanu, un tā sastāv no pietiekami smalkām daļiņām, kas paliek suspendētas ūdens vertikālajā slānī ilgāku laiku un tiek aizskalotas ar plūsmu. Tādēļ kopējā dienas barības deva jāsadala mazākās porcijās, un barošana jāveic vismaz divas reizes dienā. Barošanas režīms attiecībā uz konkrēto barību attēlots 1. tabulā. Barošanas biežumu dokumentē. Barību var izmantot sausā veidā vai kā izejšķīdumu, kas sagatavots ar atšķaidīšanas ūdeni. Svaigu izejšķīdumu jāsagatavo katru otro dienu; ja to neizmanto uzreiz, tas jāuzglabā 4 °C temperatūrā.

1. tabula.

Barošanas režīms AMT ar caurplūdes apstākļiem validēšanas pētījumos, izmantojot komerciālo kurkuļu barību tajā testa posmā, kamēr *X.laevis* kurkuļi ir dzīvi

Pētījuma diena	Uzturnorma (mg uz dzīvnieku dienā)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analītiskā ķīmija

14. Pirms pētījuma veikšanas ir jānovērtē testējamās vielas stabilitāte, izmantojot pieejamo informāciju par tās šķīdību, noārdāmību un gaistamību. Testa sākumā (0. diena) no katras replikātu tvertnes ar katru koncentrāciju jāievāc paraugs analītiskajai ķīmiskajai analīzei, un testa laikā reizi nedēļā jāievāc vismaz četri paraugi. Ieteicams arī katru testa koncentrāciju analizēt sistēmas sagatavošanas laikā, pirms testa sākšanas, lai pārbaudītu sistēmas darbību. Turklāt ieteicams analizēt izejšķīdumus, kad tie tiek nomainīti, jo īpaši gadījumos, kad izejšķīdums nenodrošina ķīmisko vielu tādā daudzumā, kura pietiktu visā paraugu ņemšanas periodā. Ja izmanto ķīmiskās vielas, kuras dažās vai visās testa koncentrācijās nevar detektēt, ir jāveic izejšķīdumu mērījumi un jāreģistrē sistēmas plūsmas ātrums, no kuriem var izrēķināt nominālās koncentrācijas.

Ķīmiskās vielas ievadīšana

15. Testējamās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības nosaka metodi, ar kādu to ievada sistēmā. Ūdenī šķīstošas ķīmiskās vielas var izšķīdināt testēšanas ūdens alikvotā tādā koncentrācijā, kas caurplūdes sistēmā ļauj nodrošināt nepieciešamās testa koncentrācijas. Ķīmiskās vielas, kas istabas temperatūrā ir šķidras un daļēji šķīst ūdenī, var ievadīt izmantojot šķidruma:šķidruma piesātināšanas metodes. Vielas, kas istabas temperatūrā ir cietas un daļēji šķīst ūdenī, var ievadīt, izmantojot piesātināšanas kolonnas no stikla vates (7). Priekšroka dodama sistēmai bez nesējiem, tomēr dažādām testējamajām vielām var būt dažādas fizikāli ķīmiskās īpašības, kas visticamāk prasīs atšķirīgas pieejas ķīmiskās vielas ekspozīcijas ūdens sagatavošanai. Ieteicams izvairīties no šķīdinātājiem vai nesējiem, jo: *i)* daži šķīdinātāji var būt toksiski paši par sevi un/vai izraisīt nevēlamas vai negaidītas

▼M6

endokrīnas reakcijas, *ii)* ja testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija pārsniedz vielas šķīdību ūdenī (kas bieži var notikt, ja izmanto šķīdinātāju), var tikt nepareizi noteikta ietekmes koncentrācija, *iii)* šķīdinātāju izmantošana ilgāka termiņa testos var veicināt būtiskas "bioplēves" veidošanos, kas saistīta ar mikrobiālo aktivitāti. Sarežģīti testējamām ķīmiskajām vielām šķīdinātājs jāizmanto kā pēdējā iespēja, un piemērotāko metodi jāizvēlas, izmantojot ESAO Norādījumu dokumentu par sarežģītu vielu un maisījumu toksicitātes ūdenī testēšanu (4). Šķīdinātāja izvēli nosaka ķīmiskās vielas ķīmiskās īpašības. Toksicitātes ūdenī testēšanai efektīvi šķīdinātāji ir acetons, etanols, metanols, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Gadījumos, kad izmanto šķīdinātāju-nesēju, šķīdinātāja koncentrācijai jābūt mazākai par hronisku nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)*; ESAO Norādījumu dokuments iesaka maksimālo koncetrāciju 100 µl/l; jaunākajā pārskatītajā redakcijā ieteikts izmantot daudz zemāku šķīdinātāja koncentrāciju – 20 µl/l atšķaidīšanas ūdens (12). Ja izmanto šķīdinātājus-nesējus, papildus kontrolgrupām bez šķīdinātāja (tīrs ūdens) jāizvērtē arī atbilstošas kontrolgrupas ar šķīdinātāju. Ja ķīmisko vielu tās fizikāli ķīmisko īpašību dēļ (zema šķīdība) vai ierobežotas ķīmiskās pieejamības dēļ nav iespējams ievadīt caur ūdeni, var apsvērt tās ievadīšanu ar barību. Ir veikts sagatavošanas darbs ekspozīcijai caur barību, taču šis ekspozīcijas ceļš parasti netiek lietots. Metodes izvēle jādokumentē un analītiski jāpierāda.

Testa koncentrāciju izvēle

Augstas testa koncentrācijas noteikšana

16. Šā testa vajadzībām jānosaka augsta testa koncentrācija, izvēloties zemāko no šiem rādītājiem: testējamās ķīmiskās vielas šķīdības robeža; maksimālā pieļaujamā koncentrācija (MPK) akūti toksiskām ķīmiskām vielām vai 100 mg/l.

17. MPK definē kā ķīmiskās vielas augstāko testa koncentrāciju, kuras izraisītā mirstība ir mazāka par 10 %. Šīs pieejas izmantošanai nepieciešami empīriski akūtās mirstības dati, no kuriem iespējams aplēst MPK. MPK noteikšana var būt neprecīza, un parasti ir nepieciešams profesionāls vērtējums. Kaut arī tehniski visdrošākā pieeja MPK noteikšanā būtu regresijas modeļu izmantošana, noderīgu MPK aptuveno vērtību var iegūt arī no esošajiem akūtās toksicitātes datiem, izmantojot 1/3 no akūtās LC_{50} vērtības. Tomēr akūtās toksicitātes dati var nebūt pieejami attiecībā uz testējamo sugu. Ja nav pieejami sugai specifiski akūtās toksicitātes dati, var veikt 96 stundu LC_{50} testu ar kurkuļiem, kas reprezentē (proti, ir tajā pašā attīstības stadijā) AMT izmantojamos kurkuļus. Alternatīvi, ja ir pieejama informācija par citām ūdenī dzīvojošām sugām (piem., LC_{50} pētījumi zivīm vai citām abinieku sugām), ar profesionālas izvērtēšanas palīdzību iespējams aplēst MPK, pamatojoties uz starpsugu ekstrapolāciju.

18. Alternatīvi, ja ķīmiska viela nav akūti toksiska un tās šķīdība ir virs 100 mg/l, tad 100 mg/l jāuzskata par augstāko testa koncentrāciju *(HTC)*, jo šī koncentrācija parasti tiek uzskatīta par "praktiski netoksisku".

▼M6

19. Kaut arī tas ir mazāk ieteicami, gadījumos, kad caurplūdes metodes ir neatbilstošas MPK sasniegšanai, var izmantot statisku sistēmu ar periodisku ūdens nomaiņu. Ja izmanto statiskās sistēmas ar periodisku ūdens nomaiņu, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas stabilitātei jābūt dokumentētai un tai jāiekļaujas izpildes kritēriju robežās. Ieteicami 24 stundu ūdens nomaiņas periodi. Nav pieņemami nomaiņas periodi, kas pārsniedz 72 stundas. Katra nomaiņas perioda beigās, tieši pirms ūdens nomaiņas, jāmēra ūdens kvalitātes parametri (piem., izšķīdušais skābeklis, temperatūra, pH utt.).

Testa koncentrāciju diapazons

20. Nepieciešamais *minimums* ir trīs testa koncentrācijas un tīra ūdens kontrolgrupa (un nesējvielas kontrolgrupa, ja nepieciešams). Mazākā atšķirība starp augstāko un zemāko testa koncentrāciju ir aptuveni viena lieluma kārta. Maksimālā devu atstarpe ir 0,1, minimālā ir 0,33.

PROCEDŪRA

Testa sākums un norise

0. diena

21. Ekspozīcija jāuzsāk tad, kad pietiekams skaits kurkuļu pirmsekspozīcijas pamatgrupā ir sasnieguši 51. attīstības stadiju saskaņā ar Nivkopu un Fāberu (8), un tā ir sasniegta pēc 17 vai mazāk dienām pēc apaugļošanas. Izvēloties testējamos dzīvniekus, veselus un normāla izskata kurkuļus no pamatgrupas ievieto vienā traukā, kurā ir pietiekams daudzums atšķaidīšanas ūdens. Lai noteiktu attīstības stadiju, kurkuļus pa vienam izņem no kopējās tvertnes, izmantojot nelielu tīklu vai sietu, un ievieto caurspīdīgā mērīšanas kamerā (piem., 100 mm Petri plate) ar atšķaidīšanas ūdeni. Nosakot attīstības stadiju, vēlams neizmantot anestēziju, tomēr drīkst veikt anestēziju individuāliem kurkuļiem, izmantojot trikaīna metānsulfonātu (piem., MS-222), kas pirms lietošanas atbilstoši buferēts ar nātrija bikarbonātu (pH 7,0). Šādā gadījumā no pieredzējušām laboratorijām jāiegūst informācija par metodiku, kā, piem., MS-222, izmanto anestēzijai, un tā jāietver pārskatā par testa rezultātiem. Pārvietošanas laikā ar dzīvniekiem jāstrādā uzmanīgi, lai mazinātu stresu un izvairītos no ievainojumiem.

22. Dzīvnieku attīstības stadijas nosaka, izmantojot binokulāro preparēšanas mikroskopu. Lai samazinātu galīgās atšķirības attīstības stadijās, ir svarīgi stadijas novērtēt iespējami precīzi. Saskaņā ar Nivkopu un Fāberu (8) 51. stadijas noteikšanas primārais attīstības orientieris ir pakaļējās ekstremitātes morfoloģija. Pakaļējo ekstremitāšu morfoloģiskie parametri ir jāizmeklē mikroskopā. Lai iegūtu precīzu informāciju par kurkuļu stadiju novērtēšanu, jāiepazīstas ar pilnu Nivkopa un Fābera (8) norāžu saturu, tomēr iespējams ticami noteikt metamorfozes stadijas arī izmantojot morfoloģiskās pazīmes. Lai vienkāršotu un standartizētu stadiju novērtēšanu, izmantojot viegli saskatāmās ar dažādām attīstības stadijām saistītas morfoloģiskās pazīmes, izmantojama turpmāk pievienotā tabula, pieņemot, ka attīstība ir normāla.

▼M6

2. tabula.

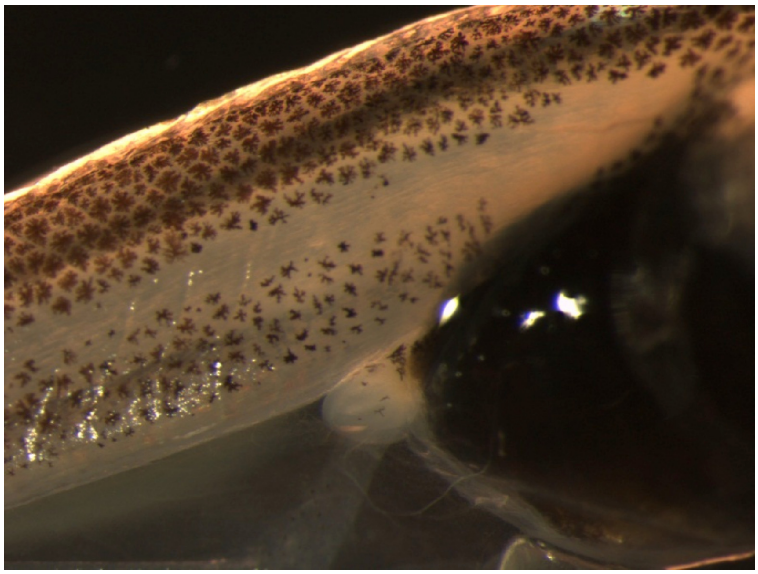
Viegli saskatāmas attīstības stadiju morfoloģiskās pazīmes saskaņā ar Nivkopa un Fābera (8) norādēm.

Redzamākie morfoloģiskie orientieri	Attīstības stadija															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Pakaļējā ekstremitāte	X	X	X	X	X	X	X									
Priekšējā ekstremitāte						X	X	X	X	X						
Galvaskausa struktūras										X	X	X	X			
Ožas nerva morfoloģija											X	X	X			
Astes garums													X	X	X	X

23. Testa sākumā visiem kurkuļiem jābūt 51. attīstības stadijā. Labākais morfoloģiskais orientieris šīs stadijas konstatēšanai ir pakaļējās ekstremitātes morfoloģija, parādīta 1. attēlā.

1. attēls.

51. attīstības stadijas *X. laevis* kurkuļa pakaļējās ekstremitātes morfoloģija.



24. Līdztekus atlasei pēc attīstības stadijas var izmantot arī eksperimenta dzīvnieku atlasi pēc izmēra. Šim nolūkam 0. dienā jāizmēra kopējais ķermeņa garums (nevis purna-kloākas garums) parauga daļai, kurā ir apmēram 20 kurkuļi 51. attīstības stadijā pēc Nivkopa-Fābera. Kad aprēķināts šīs grupas kurkuļu vidējais visa ķermeņa garums, var noteikt eksperimenta dzīvnieku visa ķermeņa garuma minimālās un maksimālās robežas, pieļaujot vidējo vērtību svārstības ± 3 mm (51. stadijas kurkuļiem visa ķermeņa garuma vidējās vērtības ir diapazonā 24,0–28,1 mm). Tomēr galvenais parametrs, novērtējot katra testējamā dzīvnieka gatavību, ir attīstības stadija. Kurkuļi ar redzamiem iedzimtiem defektiem vai ievainojumiem jāizslēdz no testa.

▼M6

25. Kurkuļus, kas atbilst iepriekš aprakstītajiem attīstības stadijas kritērijiem, tur tvertnē ar tīru kultivēšanas ūdeni, līdz sasniegta nepieciešamā attīstības stadija. Kad nepieciešamā attīstības stadija sasniegta, kurkuļus vienmērīgi izvieto ekspozīcijas tvertnēs, līdz katrā tvertnē ir 20 kurkuļi. Katru ekspozīcijas tvertni novēro, lai noteiktu anomāla izskata dzīvniekus (piem., ar ievainojumiem, neparastu peldēšanas uzvedību utt.). Acīmredzami neveselīga izskata kurkuļi jāizņem no ekspozīcijas tvertnēm un jāaizvieto ar kurkuļiem, kas no jauna ņemti no kopējās tvertnes.

Novērojumi

26. Padziļinātu informāciju par testa pabeigšanas procedūrām un kurkuļu apstrādi var iegūt ESAO Norādījumu dokumentā par abinieku vairogdziedzera histoloģiju (9).

Mērījumi septītajā dienā

27. Septītajā dienā katram replikātam no katras testa tvertnes paņem piecus nejauši izvēlētus kurkuļus. Nejaušajai atlasei jānodrošina, ka visiem testa dzīvniekiem ir vienāda varbūtība tikt izvēlētiem. Tas sasniedzams ar jebkuru nejaušās izvēles metodi, nepieciešams, lai kurkuļi tiktu ķerti ar tīkliņu. Neatlasītos kurkuļus atlaiž atpakaļ izcelsmes tvertnē, bet atlasītos kurkuļus humāni eitanazē ar 150–200 mg/l, piem., MS-222, kas pH 7,0 sasniegšanai attiecīgi buferēts ar nātrija bikarbonātu. Eitanazētos kurkuļus noskalo ar ūdeni un nosusina sausus, tad nosver ar precizitāti līdz miligramam. Katram kurkulim nosaka pakaļējās ekstremitātes garumu, garumu no purna līdz kloākai un attīstības stadiju (izmantojot binokulāro preparēšanas mikroskopu).

Mērījumi 21. dienā (testa pabeigšana)

28. Testa beigās (21. dienā) atlikušos kurkuļus izņem no testa tvertnēm un humāni eitanazē ar 150–200 mg/l, piem., MS-222, kas buferēts ar nātrija bikarbonātu, kā norādīts iepriekš. Kurkuļus noskalo ūdenī, nosusina sausus, un to ķermeņa svaru nosaka ar precizitāti līdz miligramam. Katram kurkulim nosaka attīstības stadiju, garumu no purna līdz kloākai un pakaļējās ekstremitātes garumu.

29. Histoloģiskajai novērtēšanai visus kurkuļus ievieto Davidsona fiksācijas šķīdumā uz 48–72 stundām kā visa ķermeņa paraugus vai arī kā galvas audu paraugus, kuros ietilpst apakšžoklis. Histopatoloģijas analīzēm ievāc piecus kurkuļus no katras replikāta tvertnes. Tā kā folikulārās šūnas augstums ir atkarīgs no attīstības stadijas (10), histoloģijas analīzēm vispiemērotākā atlases pieeja ir vienas attīstības stadijas īpatņu izmantošana, kad vien iespējams. Lai atlasītu vienas attīstības stadijas īpatņus, visu kurkuļu attīstības stadijas jānovērtē jau pirms atlases un turpmākās datu apstrādes, kas nepieciešama datu ievākšanai un saglabāšanai. Tas nepieciešams, jo normālas atšķirības attīstībā izraisa attīstības stadiju sadalījuma atšķirības katrā replikāta tvertnē.

30. Histopatoloģijai atlasītajiem dzīvniekiem (n = 5 no katra replikāta) pēc iespējas jālīdzinās kontrolgrupas dzīvnieku (apvienotie replikāti) vidējiem parametriem. No replikātu tvertnēm, kurās jābūt vairāk nekā pieciem kurkuļiem vajadzīgajā attīstības stadijā, nejauši atlasa piecus kurkuļus.

▼M6

31. Ja replikātu tvertnē ir mazāk nekā pieci kurkuļi vajadzīgajā attīstības stadijā, nejauši atlasa indivīdus no nākamās zemākās vai augstākās attīstības stadijas, lai katrā replikātā parauga lielums būtu pieci kurkuļi. Lēmumu ņemt kurkuļus no nākamās zemākās vai augstākās attīstības stadijas ieteicams pamatot ar stadiju sadalījuma vispārēju novērtējumu kontrolgrupas un ķīmiskās apstrādes tvertnēs. Proti, ja ķīmiskā apstrāde ir saistīta ar attīstības retardāciju, tad papildu kurkuļi jāatlasa no nākamās zemākās stadijas. Savukārt ja ķīmiskā apstrāde ir saistīta ar attīstības paātrināšanos, papildu kurkuļi jāiegūst no nākamās augstākās stadijas.

32. Ja apstrāde ar testējamo ķīmisko vielu ir izraisa ievērojamas pārmaiņas kurkuļu attīstībā, stadiju izkliede ķīmiskās apstrādes grupā var atšķirties no kontrolgrupā aprēķinātās vidējās attīstības stadijas, un attīstības pakāpes var nepārklāties. Tikai šādos gadījumos atlases procesu var mainīt, iekļaujot attīstības stadijas, kas atšķiras no kontrolgrupas vidējās attīstības pakāpes, lai sasniegtu stadijai atbilstošu kurkuļu ieguvi vairogdziedzera histopatoloģijai. Ja stadijas nav nosakāmas (t. i., asinhronija), histoloģijai nejauši izvēlas piecus kurkuļus no katra replikāta. Ja notiek jebkāda kurkuļu ieguve no stadijām, kas neatbilst kontrolgrupas vidējai attīstībai, šādas ieguves iemesli ir jāatspoguļo pārskatā.

Bioloģisko beigupunktu noteikšana

33. Ekspozīcijas fāzes, kura ilgst 21 dienu, laikā, 7. un 21. dienā jāveic primāro beigupunktu mērījumi, taču testa dzīvnieku novērojumi jāveic katru dienu. 3. tabula sniedz pārskatu par beigupunktu mērījumiem un par attiecīgajiem laika punktu novērojumiem. Papildu informācija par apikālo beigupunktu mērījumu tehnisko procesu un histoloģiskajiem novērtējumiem sniegta ESAO norādījumu dokumentos (9).

3. tabula.

Abinieku metamorfozes testa (AMT) primāro beigupunktu novērošanas laiki

Apikālie beigupunkti	Katru dienu	7. diena	21. diena
— Mirstība	•		
— Attīstības stadija		•	•
— Pakaļējās ekstremitātes garums		•	•
— Purna-kloākas garums		•	•
— Ķermeņa svars (mitrais parauga svars)		•	•
— Vairogdziedzera histoloģija			•

▼M6

Apikālie beigupunkti

34. Attīstības stadija, pakaļējās ekstremitātes garums, garums no purna līdz kloākai (*SVL*) un mitrais svars ir abinieku metamorfozes testa apikālie beigupunkti, turpmākajā tekstā ir īsi apskatīts katrs no tiem. Norādījumu dokumentos, uz kuriem dota atsauce, ir pieejama sīkāka tehniska informācija par šo datu ievākšanu, kā arī par ieteicamo analīzi ar datora palīdzību.

Attīstības stadija

35. *X. laevis* kurkuļu attīstības stadijas nosaka saskaņā Nivkopa un Fābera (8) izstrādātajiem attīstības stadiju kritērijiem. Informāciju par attīstības stadijām izmanto, lai noteiktu, vai attīstība ir paātrināta, asinhrona, novēlota vai neietekmēta. Paātrināta vai novēlota attīstība ir nosakāma, salīdzinot kontrolgrupu un apstrādes grupu mediāno attīstības stadiju. Attīstība uzskatāma par asinhronu, kad pārbaudītie audi nav ne kroplīgi, ne anomāli, bet morfoģenēzes vai atsevišķu audu relatīvā attīstības norise laikā ir traucēta vienam īpatnim.

Pakaļējās ekstremitātes garums

36. Pakaļējo ekstremitāšu diferenciācija un augšana notiek vairogdziedzera hormonu ietekmē, un tā ir attīstības stadijas noteikšanas galvenais orientieris. Pakaļējo ekstremitāšu augšanu izmanto kā kvalitatīvu parametru attīstības stadiju novērtēšanā, taču šeit to uzskata par kvantitatīvu beigupunktu. Tādēļ pakaļējās ekstremitātes garumu mēra kā beigupunktu, lai noteiktu ietekmi uz vairogdziedzera asi (2. attēls). Lai nodrošinātu konsekvenci, garumu mēra kreisajai pakaļējai ekstremitātei. Pakaļējās ekstremitātes garumu nosaka testa 7. un 21. dienā. Kā redzams 2. attēlā, 7. dienā pakaļējās ekstremitātes garuma mērīšana ir vienkārša. Sarežģītāka ir mērīšana 21. dienā, jo ekstremitātei ir izliekums. Tādēļ pakaļējās ekstremitātes mērījums 21. dienā jāsāk no ķermeņa virskārtas un tad pa ekstremitātes viduslīniju pāri visiem izliekumiem. Pakaļējās ekstremitātes garums 7. dienā, pat ja tas nav novērojams 21. dienā, joprojām ir uzskatāms par nozīmīgu, vērtējot potenciālo vairogdziedzera darbību. Garuma mērījumi tiek iegūti no digitālajām fotogrāfijām, izmantojot attēlu apstrādes programmatūru, kas aprakstīta ESAO Norādījumu dokumentā par abinieku vairogdziedzera histoloģiju (9).

Ķermeņa garums un mitrais svars

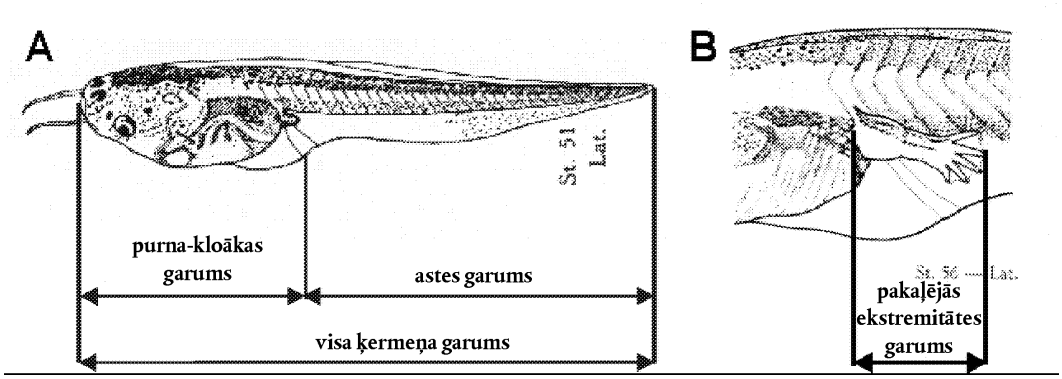
37. Garuma no purna līdz kloākai *(SVL)* (2. attēls) un mitrā svara rādījumi ir iekļauti testēšanas protokolā, lai novērtētu testējamo ķīmisko vielu iespējamo ietekmi uz kurkuļu augšanas ātrumu salīdzinājumā ar kontrolgrupu, un šie rādītāji ir lietderīgi, lai novērtētu vispārējo ķīmiskās vielas toksicitāti. Pirms svēršanas liekā ūdens nosusināšana no kurkuļiem var tiem izraisīt stresu un ādas bojājumus, tādēļ šie mērījumi 7. dienā tiek veikti ar daļu ievāktā parauga, un ar visiem pārējiem kurkuļiem testa beigās (21. dienā). Konsekvences labad astes robežas noteikšanai, velciet iedomātu līniju no galvaskausa virspuses uz kloāku.

38. Purna-kloākas garumu izmanto kurkuļu augšanas novērtēšanā, kā parādīts 2. attēlā.

▼M6

2. attēls.

***X. laevis* kurkuļu (A) ķermeņa garuma mērījumu veidi un (B) pakaļējās ekstremitātes garuma mērījumi (1).**



Vairogdziedzera histoloģija

39. Kaut arī attīstības stadija un pakaļējās ekstremitātes garums ir nozīmīgi beigupunkti, lai novērtētu ekspozīcijas ķīmiskajai vielai izraisītās pārmaiņas metamorfajā attīstībā, attīstības aizturi pašu par sevi nevar uzskatīt par diagnostikas indikatoru vairogdziedzera darbību kavējošai aktivitātei. Dažas pārmaiņas ir konstatējamas tikai veicot rutīnas histopatoloģisko analīzi. Diagnostikas kritēriji ietver vairogdziedzera hipertrofiju/atrofiju, folikulāro šūnu hipertrofiju, folikulāro šūnu hiperplāziju un kā papildu kvalitatīvos kritērijus arī folikulārā lūmena laukumu, koloidāla kvalitāti un folikulāro šūnu augstumu/formu. Pārskatā jāiekļauj smaguma gradācija (4 pakāpes). Informācija par histoloģisko paraugu iegūšanu un apstrādi audu paraugu histoloģiskajai analīzei ir pieejama dokumentā "Abinieku metamorfozes tests: 1. daļa – tehniskie norādījumi attiecībā uz morfoloģisko paraugu ņemšanu un histoloģisko sagatavošanu" un "Abinieku metamorfozes tests: 2. daļa – ieteikumi pētījumu lasīšanai, diagnostikas kritērijiem, izpausmes gradācijai un atlass" (9). Laboratorijām, kas veic testu pirmo(-ās) reizi(-es), pirms histoloģisko analīžu un vairogdziedzera novērtēšanas veikšanas ir mācību nolūkā jākonsultējas ar pieredzējušiem patologiem. Acīmredzamas un būtiskas pārmaiņas apikālos beigupunktos, kas liecina par attīstības paātrinājumu vai asinhroniju, var izslēgt nepieciešamību veikt vairogdziedzera histopatoloģisko analīzi. Tomēr acīmredzamu morfoloģisku pārmaiņu neesība vai attīstības aizture pieprasa histoloģisko analīžu veikšanu.

Mirstība

40. Katru dienu visās testa tvertnēs pārbauda mirušu kurkuļu klātbūtni, un iegūtos skaitļus katrai tvertnei pieraksta. Katrai novērotajai mirstībai reģistrē datumu, testējamās vielas koncentrāciju un tvertnes numuru. Mirušie dzīvnieki iespējami ātri ir jāizņem no testa tvertnes. Ja mirstība pārsniedz 10 %, tas var liecināt par neatbilstošiem testēšanas apstākļiem vai par testējamās ķīmiskās vielas toksisko iedarbību.

Papildu novērojumi

41. Ir jāreģistrē anomāla uzvedība, uzkrītoši redzami iedzimti defekti un ievainojumi. Anomāla uzvedības, redzamu iedzimtu defektu un ievainojumu gadījumā reģistrē datumu, testējamās vielas koncentrāciju un tvertnes numuru. Normālai uzvedībai raksturīgs, ka ūdenī esošajiem kurkuļiem aste atrodas augstāk par galvu, ir regulāras astes spuras kustības, tie periodiski uzpeld līdz ūdens virspusei, tiem ir žaunu vāki, atbild uz stimuliem.

▼M6

Par anomālu uzvedību liecina, piem., peldēšana ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzpeldēšana virspusē, nereaģēšana uz stimuliem. Papildus jāreģistrē arī redzamas atšķirības barības uzņemšanā starp apstrādes replikātiem. Redzami iedzimti defekti un ievainojumi var būt morfoloģiskas anomālijas (piem., ekstremitāšu deformācijas), hemorāģiski bojājumi, baktēriju vai sēnīšu infekcijas u. c. Šie rādītāji ir kvalitatīvi un uzskatāmi par slimības/-stresa klīniskajām pazīmēm, tos iegūst salīdzinājumā ar kontrolgrupas dzīvniekiem. Ja šo pazīmju vai to sastopamības biežums eksponētajās tvertnēs ir lielāks nekā kontrolgrupā, pieņem, ka tos izraisījis acīmredzams toksiskums.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Datu vākšana

42. Visi dati ir jāapkopo, izmantojot elektroniskas vai manuālas sistēmas saskaņā ar labas laboratorijas prakses *(GLP)* standartiem. Pētījuma rezultātos ietilpst:

Testējamā viela:

— testējamās ķīmiskās vielas raksturlielumi: fizikālķīmiskās īpašības; informācija par stabilitāti un bionoārdāmību;

— ķīmiskā informācija un dati: šķīdumu sagatavošanas metode un biežums. Informācijā par testējamo ķīmisko vielu jāiekļauj testējamās vielas faktiskā un nominālā testējamās vielas koncentrācija, atsevišķos gadījumos arī ķīmiskie atvasinājumi. Testējamās ķīmiskās vielas analīzes var būt nepieciešamas gan izejšķīdumiem, gan testējamajiem šķīdumiem;

— šķīdinātājs (ja tas nav ūdens): šķīdinātāja izvēles pamatojums, šķīdinātāja raksturlielumi (veids, izmantotās koncentrācijas).

Testēšanas apstākļi:

— darbību apraksti: novērojumi, kas attiecas uz testēšanas sistēmas darbību, atbalstošo vidi un infrastruktūru. Tipiskie darbības apraksti ietver: telpas temperatūru, testa vides temperatūru, fotoperiodu, ekspozīcijas sistēmas kritiskos komponentus (piem., sūkņus, ciklu skaitītājus, spiedienus), plūsmas mērījumus, ūdens līmeņus, bāzes pudeļu nomaiņas, ierakstus par barošanām. Ūdens kvalitātes vispārīgie rādītāji ir: pH, izšķīdušais skābeklis, elektrovadītspēja, kopējais joda daudzums, sārmainība, cietība;

— novirzes no testēšanas metodes: šeit jāiekļauj jebkāda informācija vai paskaidrojumi par novirzēm no testēšanas metodes.

Rezultāti:

— bioloģiskie novērojumi un dati ietver: ikdienas mirstības novērojumus, barības uzņemšanu, neparastu peldēšanas uzvedību, letarģiju, līdzsvara zudumus, redzamus iedzimtus defektus, ievainojumus u. c. Iepriekš noteiktos intervālos veiktie novērojumi un ievāktie dati ietver: attīstības stadiju, pakaļējās ekstremitātes garumu, attālumu no purna līdz kloākai, mitro svaru;

▼M6

— statistiskās analīzes metodes un izvēlēto metožu pamatojums; statistiskās analīzes rezultāti, kurus vēlams sniegt tabulas formā;

— histoloģiskie dati ietver: izskaidrojošus aprakstus, kā arī specifisko novērojumu smagumu pa gradācijas pakāpēm un sastopamības biežumu; sīkāk izklāstīts histopatoloģijas norādījumu dokumentā;

— *ad hoc* novērojumi ietver: pētījuma laikā iegūtus aprakstus, kas neietilpst nevienā no iepriekš aprakstītajām kategorijām.

Datu pārskats

43. Otrajā papildinājumā sniegtas datu vākšanas izklājlapas, ko var izmantot kā paraugu jēldatu ievadei un apkopojošajiem statistiskajiem aprēķiniem. Papildus ir sniegtas tabulas, kas ir ērtas beigupunktu datu apkopošanai. Histoloģisko novērtējumu tabulas ir ievietotas 2. papildinājumā.

Veiktspējas kritēriji un testa pieņemamība/ticamība

44. Būtiskas novirzes no testēšanas metodes radīs interpretācijai un ziņošanai nepieņemamus datus. Tādēļ 4. tabulā ir izstrādāti norādījumi veiktā testa kvalitātes un kontrolgrupas organismu vispārējā stāvokļa noteikšanai.

4. tabula.

Abinieku metamorfozes testa (AMT) veiktspējas kritēriji

Kritērijs	Pieņemamās robežas
Testa koncentrācijas	Uztur pie ≤ 20 % *CV* (izmērītās testa koncentrācijas variācija) visā 21 dienu testa laikā
Mirstība kontrolgrupā	≤ 10 % mirstība jebkurā kontrolgrupas replikātā nedrīkst pārsniegt 2 kurkuļus
Minimālā vidējā attīstības stadija kontrolgrupās testa beigās	57
Attīstības stadiju izkliede kontrolgrupā	Attīstības stadiju sadalījuma 10. un 90. procentīle nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 4 attīstības stadijām
Izšķīdušais skābeklis	≥ 40 % gaisa piesātinājuma (*)
pH	pH jāuztur robežās no 6,5 līdz 8,5 Atšķirības starp replikātiem un iedarbības veidiem nedrīkstētu pārsniegt 0,5.
Ūdens temperatūra	22° ± 1 °C – atšķirības starp replikātiem un iedarbības veidiem nedrīkstētu pārsniegt 0,5 °C
Testa koncentrācijas bez acīmredzama toksiskuma	≥ 2
Replikātu vērtējums	Tests ir apšaubāms, ja tam ir ≤ 2 replikāti

▼M6

Kritērijs	Pieņemamās robežas
Šķīdinātāja izmantošanas īpašie nosacījumi	Ja lieto šķīdinātāja nesēju, ir jāizveido kontrolgrupas gan šķīdinātājam, gan tīram ūdenim, un par rezultātiem jāziņo.
	Statistiski būtiskas atšķirības starp šķīdinātāja kontrolgrupas un ūdens kontrolgrupām ir jāapskata atsevišķi. Papildu informāciju sk. turpmāk.
Īpaši nosacījumi statiskai sistēmai ar periodisku ūdens nomaiņu	Jāziņo par reprezentatīvām ķīmiskajām analīzēm pirms un pēc ūdens nomaiņas
	Amonjaka līmenis jāmēra tieši pirms ūdens nomaiņas
	Visi 1. papildinājuma 1. tabulā minētie kvalitātes parametri jāmēra tieši pirms ūdens nomaiņas
	Nomaiņas periods nedrīkst pārsniegt 72 stundas
	Atbilstošs barošanas režīms (komerciālā kurkuļu barība, 50 % dienas normas)

(*) Ūdens aerācija var tikt nodrošināta ar barbotieriem. Barbotierus vēlams novietot tādā augstumā, kas neietekmē kurkuļu uzvedību un attīstību.

Testa derīgums

45. Lai testu atzītu par pieņemamu/derīgu, tam jāatbilst šādām prasībām:

derīgs testa eksperiments, kas atzīstams par vairogdziedzera aktivitāti neietekmējošu:

(1) jebkurai apstrādei (tostarp kontrolgrupās) mirstība nedrīkst pārsniegt 10 %. Katrā replikātā mirstība nedrīkst pārsniegt trīs īpatņus, citādi replikāts uzskatāms par apšaubāmu;

(2) analīzei pieejami vismaz divi apstrādes līmeņi, ar visiem četriem replikātiem, kas visi ir neapšaubāmi;

(3) analīzei pieejami vismaz divi apstrādes līmeņi bez acīmredzama toksiskuma.

Derīgs testa eksperiments, kas atzīstams par vairogdziedzera aktivitāti ietekmējošu:

(1) kontrolgrupā mirstība nedrīkst būt lielāka kā divi kurkuļi uz replikātu.

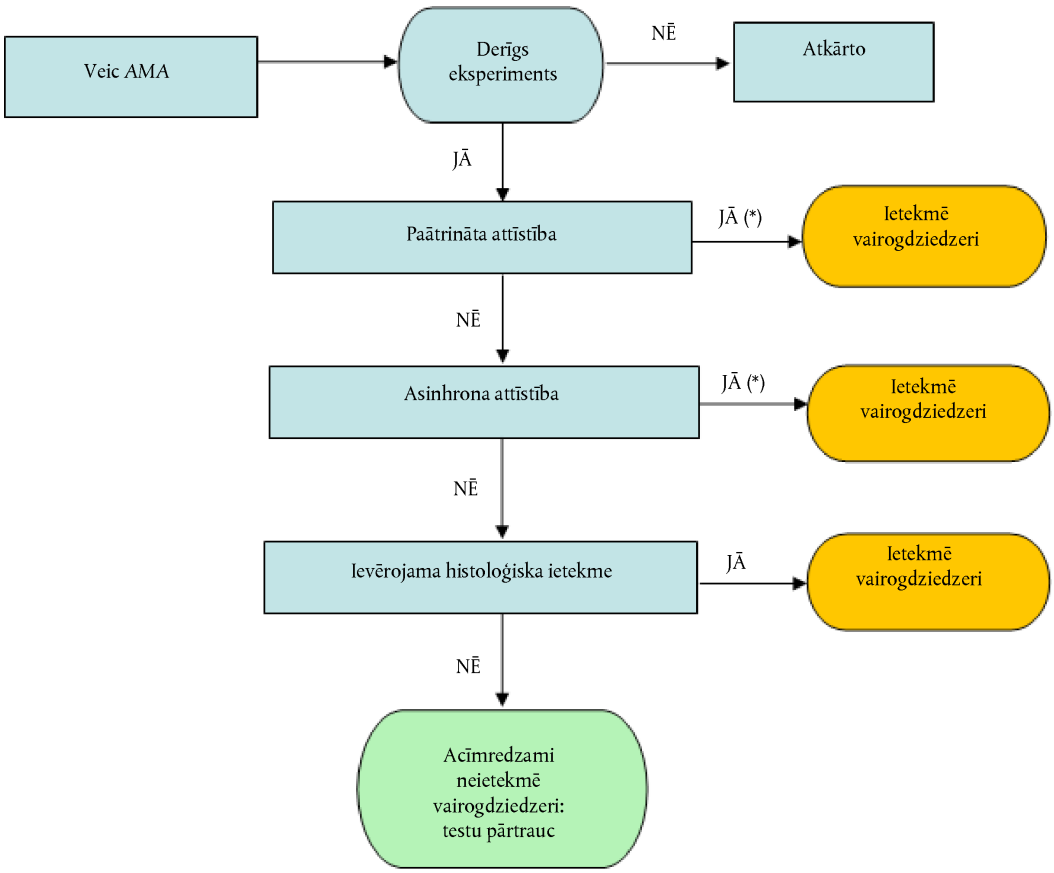
Abinieku metamorfozes testa (AMT) lēmumu pieņemšanas loģika

46. Abinieku metamorfozes testa lēmumu pieņemšanas loģika ir izstrādāta, lai nodrošinātu loģisku palīdzību biotestēšanas rezultātu ieguvei un interpretācijai (sk. shēmu 3. attēlā). Lēmumu pieņemšanas loģika izvērtē iegūtos beigupunktus: paātrināta attīstība, asinhrona attīstība un vairogdziedzera histopatoloģija tiek uzskatīta par ļoti nozīmīgiem, bet palēnināta attīstība, purna-kloākas garums un mitrais parauga svars ir parametri, ko uzskata par mazāk nozīmīgiem, jo tos var ietekmēt vispārīgais toksiskums.

▼M6

3. attēls.

Lēmumu pieņemšanas loģika abinieku metamorfozes testa (AMT) veikšanai



(*) Dažas regulatīvās iestādes var pieprasīt histoloģijas analīžu veikšanu, neskatoties uz būtiskām atšķirībām paātrinātā un asinhronā attīstībā. Pirms testa veikšanas ir ieteicams konsultēties ar attiecīgajām iestādēm, lai noskaidrotu, kādi beigupunkti ir vajadzīgi.

Paātrināta attīstība (noteikta, izmantojot attīstības stadiju, purna-kloākas garumu (SVL) un pakaļējās ekstremitātes garumu)

47. Ir zināms, ka paātrināta attīstība var notikt vienīgi vairogdziedzera hormonu ietekmē. Tās var būt perifēro audu izmaiņas, piem., tiešā mijiedarbībā ar vairogdziedzera hormonu receptoru (piem., T4), vai izmaiņas cirkulējošo vairogdziedzera hormonu līmenī. Jebkurā gadījumā to uzskata par pietiekamu pierādījumu tam, ka ķīmiskā viela ietekmē vairogdziedzera darbību. Paātrinātu attīstību vērtē vienā no diviem veidiem. Pirmkārt, vispārējo attīstības stadiju var novērtēt, izmantojot iepriekš minēto standartizēto pieeju, ko apraksta Nivkops un Fābers (8). Otrkārt, var izmantot specifisko morfoloģisko pazīmju, piem., pakaļējās ekstremitātes garuma mērījumus 7. un 21. dienā, kas ir pozitīvi saistīti ar agonistu iedarbību uz vairogdziedzera hormonu receptoru. Ja konstatē būtisku paātrinājumu pakaļējās ekstremitātes attīstībā, tas liecina, ka ķīmiskā viela ietekmē vairogdziedzera darbību.

▼**M6**

48. Testa dzīvnieku novērtēšana un salīdzināšana ar kontrolgrupas dzīvniekiem paātrinātas attīstības gadījumā balstāma uz statistiskās analīzes rezultātiem, kas veikta ar šādiem četriem beigupunktiem:

— pakaļējās ekstremitātes garums (normalizēts ar *SVL*) pētījuma 7. dienā;

— pakaļējās ekstremitātes garums (normalizēts ar *SVL*) pētījuma 21. dienā;

— attīstības stadija pētījuma 7. dienā;

— attīstības stadija pētījuma 21. dienā.

49. Pakaļējo ekstremitāšu garuma statistiskās analīzes jāveic, pamatojoties uz kreisās pakaļējās ekstremitātes garuma mērījumiem. Pakaļējo ekstremitāšu garuma dati tiek normalizēti, izmantojot īpatņa pakaļējās ekstremitātes garuma attiecību pret īpatņa garumu no purna līdz kloākai. Turpmāk salīdzina katra apstrādes līmeņa vidējās normalizētās vērtības. Par paātrinātu attīstību liecina pakaļējās ekstremitātes garuma normalizētās vērtības būtisks palielinājums ķīmiskās apstrādes grupā salīdzinājumā ar kontrolgrupu pētījuma 7. dienā un/vai 21. dienā (sk. 3. papildinājumu).

50. Attīstības stadiju statistiskās analīzes veicamas, pamatojoties uz Nivkopa un Fābera (8) aprakstītajiem attīstības stadiju novērtēšanas morfoloģiskajiem kritērijiem. Par attīstības paātrinājumu liecina multikvantu analīzē konstatēts būtisks palielinājums attīstības stadiju vērtībās ķīmiskās apstrādes grupā salīdzinājumā ar kontrolgrupu pētījuma 7. un/vai 21. dienā.

51. Abinieku metamorfozes testā būtiska ietekme uz jebkuru no četriem iepriekš minētajiem beigupunktiem tiek uzskatīta par pietiekamu, lai detektētu paātrinātu attīstību. Tas ir, lai apstiprinātu būtisku ietekmi uz pakaļējās ekstremitātes garumu konkrētā laika punktā, nav nepieciešams, lai būtu arī būtiska ietekme uz pakaļējās ekstremitātes garumu citā laika punktā vai arī būtiska ietekme uz attīstības stadiju šajā konkrētajā laika punktā. Savukārt, lai apstiprinātu būtisku ietekmi uz attīstības stadiju konkrētā laika punktā, nav nepieciešams, lai būtu būtiska ietekme uz attīstības stadiju citā laika punktā vai arī būtiska ietekme uz pakaļējās ekstremitātes garumu šajā specifiskajā laika punktā. Tomēr paātrinātās attīstības pierādījumu nozīmīgums noteikti palielināsies, ja būtiska ietekme tiks konstatēta vairāk nekā vienā beigupunktā.

Asinhrona attīstība (noteikta, izmantojot attīstības stadiju kritērijus)

52. Asinhrona attīstība izpaužas kā morfoģenēzes vai dažādu audu attīstības relatīvās norises laikā traucējumi atsevišķam kurkulim. Ja nav iespējams skaidri noteikt organisma attīstības stadiju pēc katrai attīstības stadijai tipiskajiem morfoloģiskajiem beigupunktiem, tas liecina, ka metamorfozes laikā audi attīstās asinhroni. Asinhrona attīstība ir vairogdziedzera darbības rādītājs. Vienīgais zināmais veids, kā izraisīt asinhronu attīstību, ir ar ķīmisko vielu palīdzību iedarboties uz vairogdziedzera perifēro hormonu darbību un/vai vairogdziedzeru hormonu metabolismu attīstošos audos, piem., tādu, kāda ir novērota ar dejodināzes inhibitoriem.

▼**M6**

53. Testa dzīvnieku novērtēšana asinhronās attīstības gadījumā salīdzinājumā ar kontrolgrupas dzīvniekiem tiek balstīta uz testa dzīvnieku morfoloģisko novērtējumu 7. un 21. testa dienā.

54. Nivkopa un Fābera (8) sniegtais normālas *Xenopus laevis* attīstības raksturojums sniedz pamatu, pēc kura var noteikt normālas audu pārveidošanās secīgo kārtību. Termins "asinhrona attīstība" īpaši attiecas uz tām kurkuļa redzamās morfoloģiskās attīstības novirzēm, kas padara par neiespējamu attīstības stadiju galīgo novērtējumu saskaņā ar Nivkopa un Fābera (8) kritērijiem, jo izšķirošās morfoloģiskās pazīmes pārstāv dažādu attīstības stadiju raksturojumus.

55. Uz asinhrono attīstību attiecas tikai gadījumi, kad novērojamas specifiskas audu pārveidošanās gaitas novirzes salīdzinājumā ar citu specifisku audu pārveidošanās gaitu. Dažiem klasiskajiem fenotipiem raksturīga priekšējās ekstremitātes novēlota parādīšanās vai trūkums, kamēr pakaļējās ekstremitātes un astes audi attīstās normāli vai paātrināti, vai arī pāragra žaunu uzsūkšanās salīdzinājumā ar pakaļējās ekstremitātes attīstību un astes uzsūkšanos. Dzīvnieka attīstība ir vērtējama kā asinhrona gadījumā, ja nevar noteikt attīstības stadiju, jo tā neatbilst lielākajai daļai galveno attīstības kritēriju saskaņā ar Nivkopa-Fābera stadiju (8), vai arī novērojama nozīmīga vienas vai vairāku pamatpazīmju kavēšanās vai paātrinājums (piem., aste uzsūkusies, bet priekšējās ekstremitātes nav parādījušās). Šis novērtējums tiek veikts kvalitatīvi un ir jāpārbauda visas galvenās pazīmes saskaņā ar Nivkopu un Fāberu (8). Taču nav nepieciešams reģistrēt novēroto dzīvnieku dažādo pazīmju attīstības stadijas. Dzīvniekiem, kuru attīstība ir asinhrona, netiek piešķirta kāda no Nivkopa un Fābera norādītajām attīstības stadijām (8).

56. Līdz ar to galvenais kritērijs anomālas morfoloģiskās attīstības definēšanā par "asinhronu attīstību" ir audu pārveidošanās relatīvā norise laikā un audu morfoģenēzes traucējums, kamēr ietekmēto audu morfoloģija nav acīmredzami anomāla. Piemērs, kas ilustrē redzamo morfoloģisko anomāliju interpretāciju, ir kavēta pakaļējo ekstremitāšu morfoģenēze attiecībā pret citu audu attīstību, kas atbilst "asinhrona attīstības" kritērijam; savukārt gadījumi, kad pakaļējās ekstremitātes nav attīstījušās, novērojami anomāli pirksti (piem., ektrodaktilija vai polidaktilija) vai citi acīmredzami iedzimti ekstremitāšu defekti, netiks uzskatīti par "asinhronu attīstību".

57. Šajā kontekstā galvenās morfoloģiskās pazīmes, kuru koordinētā metamorfozes gaita ir jāizvērtē, ir pakaļējās ekstremitātes morfoģenēze, priekšējās ekstremitātes morfoģenēze, priekšējās ekstremitātes parādīšanās, astes uzsūkšanās stadija (jo īpaši – astes spuras uzsūkšanās), un galvas morfoloģija (piem., žaunu izmērs un žaunu uzsūkšanās stadija, apakšžokļa morfoloģija, Mekeļa skrimšļa izvirzījums).

58. Atkarībā no ķīmiskās vielas darbības veida var novērot dažādus redzamus morfoloģiskos fenotipus. Dažos klasiskajos fenotipos ietilpst priekšējās ekstremitātes novēlota parādīšanās vai trūkums, neskatoties uz normālu vai paātrinātu pakaļējo ekstremitāšu vai astes audu attīstību, un agrīnu žaunu uzsūkšanās salīdzinājumā ar pakaļējās ekstremitātes un astes pārveidošanos.

▼M6

Histopatoloģija

59. Ja ķīmiskā viela nav acīmredzami toksiska, nepaātrina attīstību vai neizraisa asinhronu attīstību, ir jānovērtē vairogdziedzera histopatoloģija, izmantojot attiecīgu norādījumu dokumentu (9). Attīstības aizture apstākļos, kuros nav toksiskuma, ir nozīmīgs vairogdziedzera darbību kavējošas aktivitātes rādītājs, un attīstības stadijas analīze ir mazāk jutīga un mazāk diagnostiska nekā vairogdziedzera histopatoloģiskā analīze. Tādēļ šai gadījumā ir nepieciešama vairogdziedzera histopatoloģijas analīze. Ietekme uz vairogdziedzera histoloģiju ir konstatēta arī tad, ja nav ietekmes uz attīstību. Ja konstatētas vairogdziedzera histopatoloģijas pārmaiņas, ķīmiskā viela ir uzskatāma par vairogdziedzeri ietekmējošu. Ja vairogdziedzerī nav novērota attīstības aizture vai histoloģiski bojājumi, ķīmiskā viela ir uzskatāma par vairogdziedzeri neietekmējošu. Šo lēmumu pamato tas, ka vairogdziedzeri ietekmē vairogdziedzeri stimulējošais hormons (*TSH*), un jebkura ķīmiska viela, kas maina vairogdziedzera hormonu cirkulāciju tik lielā mērā, lai mainītu arī *TSH* sekrēciju, izraisīs arī histopatoloģiskas pārmaiņas vairogdziedzerī. Cirkulējošo vairogdziedzera hormonu var ietekmēt darbības dažādi režīmi un mehānismi. Kaut arī vairogdziedzera hormonu līmenis liecina par ietekmi, kas saistīta ar vairogdziedzeri, ar to nepietiek, lai noteiktu, kurš darbības režīms vai mehānisms ir saistīts ar atbildes reakciju.

60. Tā kā šis beigupunkts nav pakļaujams parastajai statistiskajai analīzei, ar ķīmiskās vielas ekspozīciju saistītās ietekmes noteikšana jāveic, izmantojot patologa eksperta vērtējumu.

Kavēta attīstība (konstatēta pēc attīstības stadijas, pakaļējās ekstremitātes garuma, ķermeņa svara, purna-kloākas garuma (SVL))

61. Kavētu attīstību var izraisīt gan vairogdziedzera darbību kavējoši mehānismi, gan netiešs toksiskums. Viegla attīstības aizture kopā ar acīmredzamām toksiskuma pazīmēm visticamāk liecina par nespecifisku toksisku iedarbību. Ar vairogdziedzeri nesaistīta toksiskuma novērtēšana ir nozīmīga testa daļa, lai samazinātu varbūtību iegūt viltus pozitīvus rezultātus. Liela mirstība acīmredzami liecina par citu toksisku mehānismu norisi. Tāpat arī viegla augšanas samazināšanās, uz ko norāda mitrais svars, un/vai *SVL*, liecina par ietekmi, kas nav saistīta ar vairogdziedzeri. Acīmredzami palielināti ķermeņa izmēri bieži tiek novēroti kopā ar normālu attīstību ietekmējošām ķīmiskajām vielām. Attiecīgi lielāku dzīvnieku klātbūtne ne vienmēr norāda uz toksiskumu, kas nav saistīts ar vairogdziedzeri. Tomēr, nosakot toksiskumu vairogdziedzerim, nekad nevar paļauties tikai uz augšanu. Vairogdziedzera darbības novērtēšanai labāk ir izmantot augšanu kopā ar attīstības stadiju un vairogdziedzera histopatoloģiju. Acīmredzama toksiskuma novērtēšanā jāņem vērā arī tādi beigupunkti kā tūska, hemorāģiski bojājumi, letarģija, samazināta barības uzņemšana, neparasta/mainīta peldēšanas uzvedība u. c. Ja visas testa koncentrācijas liecina par acīmredzamu toksiskumu, pirms noteikšanas, vai viela ietekmē vai neietekmē vairogdziedzeri, testējamā ķīmiskā viela ir jāizvērtē pie zemākajām testa koncentrācijām.

62. Statistiski nozīmīga attīstības aizture gadījumā, ja nav citu acīmredzamu toksiskuma pazīmju, norāda, ka viela ietekmē vairogdziedzeri (antagoniski). Ja nav statistiski stingri pierādāmu datu, rezultāts ir pamatojams ar vairogdziedzera histopatoloģijas rezultātiem.

▼**M6**

Statistiskā analīze

63. Statistisko analīžu veikšanā vēlams sekot procedūrām, kas aprakstītas dokumentā "Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi" (11). Lai konstatētu būtisku apstrādes ietekmi, visiem nepārtrauktajiem kvantitatīvajiem beigupunktiem (pakaļējās ekstremitātes garums (*HLL*, purna-kloākas garums, mitrais svars), kuriem vērojama monotona reakcija uz devu, jāizmanto descendents Džonkhīra-Terpstra tests.

64. Nepārtrauktajiem beigupunktiem, kas neatbilst monotonai reakcijai uz devu, jānovērtē datu normalitāte (vēlams lietot Šapiro-Vilka testu vai Andersona-Dārlinga testu) un dispersijas homogenitāte (priekšroka ir Lēvena testam). Abus testus veic ar *ANOVA* atlikumu vērtībām. Formālo normalitātes un dispersijas homogenitātes testu vietā var izmantot ekspertu atzinumus, bet formālajiem testiem tiek dota priekšroka. Ja konstatē neatbilstību normālajam sadalījumam un dispersijas heterogenitāti, jāmeklē normalizējoša, dispersiju stabilizējoša transformācija. Ja dati (iespējams, pēc transformācijas) atbilst normālajam sadalījumam ar homogēnu dispersiju, apstrādes ietekmes būtiskumu nosaka ar Daneta testu. Ja dati (iespējams, pēc transformācijas) atbilst normālajam sadalījumam ar heterogēnu dispersiju, apstrādes ietekmes būtiskumu nosaka ar Tamheina-Daneta testu vai T3 testu, vai Manna-Vitneja-Vilkoksona U-testu. Gadījumā, kad nav iespējama normalizējoša transformācija, apstrādes ietekmes būtiskumu nosaka, izmantojot Manna-Vitneja-Vilkoksona U-testu, lietojot Bonferoni-Holma p-vērtību korekciju. Daneta testu izmanto neatkarīgi no *ANOVA* F-testa, un Manna-Vitneja testu izmanto neatkarīgi no Kruskalla-Vallisa testa.

65. Būtiska mirstība testā nav sagaidāma, tomēr ar descendentu Kohrana-Armitāža testu jānovērtē, vai dati atbilst devas-reakcijas monotonitātei; ja neatbilst, tad jāizmanto Fišera eksaktais tests ar Bonferoni-Holma korekciju.

66. Apstrādes ietekmes būtiskums uz attīstības stadijām ir nosakāms ar descendentu Džonkhīra-Terpstra testu, lietojot to uz replikātu mediānām. Ietekmes novērtēšanai var lietot arī multikvantu Džonkhīra testu no 20. līdz 80. procentīlei; šis tests ir ieteicams tādēļ, ka tas ņem vērā pārmaiņas sadalījuma profilā.

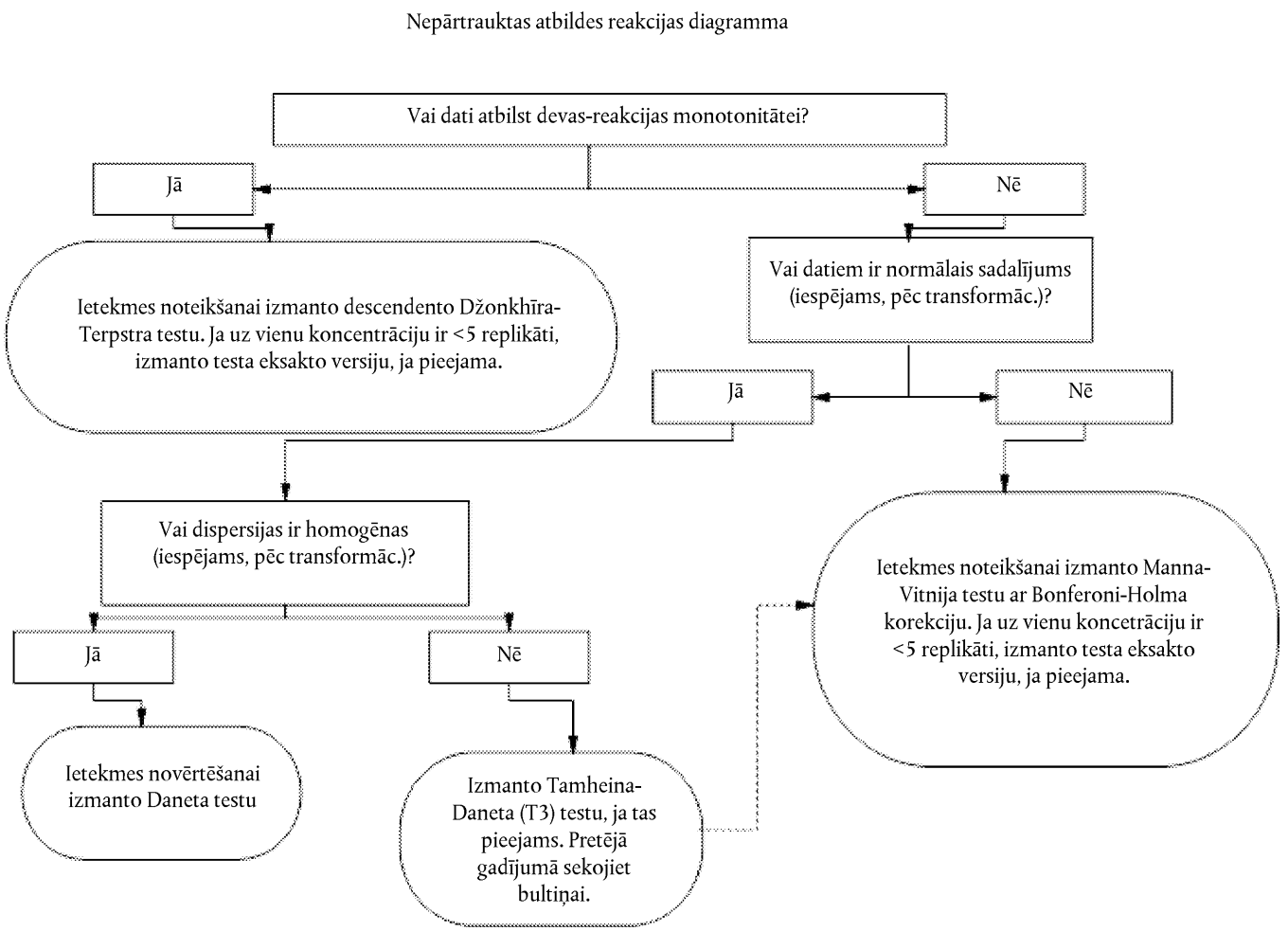
67. Atbilstošā analīzes vienība ir viens replikāts, tādēļ dati sastāv no replikātu mediānām, ja izmantots Džonkhīra-Terpstra vai Manna-Vitneja U-tests, vai no replikātu aritmētiskajiem vidējiem, ja lieto Daneta testu. Devas-reakcijas monotonitāti var novērtēt vizuāli no replikātu un apstrāžu aritmētiskajiem vidējiem vai mediānām, vai ar iepriekš aprakstītajiem formālajiem testiem. Ja ir mazāk nekā pieci apstrādes un kontrolgrupas replikāti, jālieto eksaktās Džonkhīra-Terpstra vai Manna-Vitneja testu permutāciju versijas (ja pieejamas). Visu testu statistiskā nozīme ir novērtējama ar nozīmes līmeni 0,05.

68. Nepārtrauktu datu statistiskās analīzes shēma sniegta 4. attēlā.

▼M6

4. attēls.

Statistisko pieeju diagramma nepārtrauktas atbildes reakcijas datiem.



02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Īpaši datu analīzes apsvērumi

Apšaubāmo apstrādes līmeņu lietošana

69. Nosakot, vai replikāts vai visa apstrāde liecina par acīmredzamu toksiskumu un būtu jāizslēdz no analīzes, jāņem vērā vairāki faktori. Acīmredzams toksiskums tiek definēts kā >2 mirstības jebkurā no replikātiem, ja tās var būt izskaidrojamas tikai ar toksiskumu, nevis tehnisku kļūdu. Citas acīmredzama toksiskuma pazīmes ir hemorāģijas, anomālas darbības, neparasta peldēšanas uzvedība, anoreksija un jebkuras citas klīniskas saslimšanas pazīmes. Subletālām toksiskuma pazīmēm var būt nepieciešama kvalitatīva novērtēšana, un tā vienmēr jāveic salīdzinājumā ar tīra ūdens kontrolgrupu.

Šķīdinātāja kontrolgrupa

70. Šķīdinātāja izmantošana ir apsverama tikai kā galējais līdzeklis, kad ir apsvērtas visas citas ķīmiskās ievades iespējas. Ja lieto šķīdinātāju, kopā ar to testē arī kontrolgrupu ar tīru ūdeni. Testu beidzot, jāveic šķīdinātāja potenciālās ietekmes novērtēšana. Tas ir veicams, statistiski salīdzinot šķīdinātāja kontrolgrupu un tīra ūdens kontrolgrupu. Šajā analīzē izmantojamie nozīmīgākie beigupunkti ir attīstības stadija, purna-kloākas garums un mitrais svars, jo tos var ietekmēt ar vairogdziedzeri nesaistīts toksiskums. Ja šajos beigupunktos ir konstatētas statistiski būtiskas atšķirības starp tīra ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, pētījuma beigupunkti atbildei uz testējamo vielu jānosaka, izmantojot tīra ūdens kontrolgrupu. Ja nav statistiski būtisku atšķirību starp tīra ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu visiem mērītajiem testa kritērijiem, pētījuma beigupunkti ir nosakāmi, izmantojot apvienotu šķīduma ūdens un šķīdinātāja kontrolgrupu.

Ietekmētās grupas, kas sasniegušas 60. un augstāku attīstības stadiju

71. Audu resorbcijas un absolūtā ūdens satura samazinājuma dēļ pēc 60. attīstības stadijas samazinās kurkuļu lielums un svars. Tādēļ mitrā svara un *SVL* mērījumus nevar izmantot augšanas ātrumu atšķirību statistiskajās analīzēs. Attiecīgi mitrā svara un garuma dati organismiem, kas ir vismaz 60. attīstības stadijā, jāizslēdz, un tos nevar izmantot replikātu aritmētisko vidējo un replikātu mediānu analīzēs. Lai analizētu šos ar augšanu saistītos parametrus, var izmantot divas dažādas pieejas.

72. Viena pieeja ir mitrā svara un/vai *SVL* statistiskajās analīzēs ņemt vērā tikai tos kurkuļus, kuri ir 60. attīstības stadijā vai mazākā. Ja tikai neliela testa dzīvnieku daļa tiek izslēgta no analīzes (≤ 20 %), uzskata, ka šāda pieeja sniedz pietiekami skaidru informāciju par iespējamās ietekmes uz augšanu nozīmīgumu. Ja 60. attīstības stadiju pārsniegušo kurkuļu skaits ir lielāks (≥ 20 %) vienā vai vairākās nominālajās koncentrācijās, visiem kurkuļiem ir jāveic divfaktoru *ANOVA* ar hierarhiskās dispersijas struktūru, lai novērtētu ķīmiskās apstrādes ietekmi uz augšanu, ņemot vērā vēlīno stadiju attīstību un augšanu. Norādījumi svara un garuma analīzei ar divfaktoru *ANOVA* sniegti 3. papildinājumā.

LITERATŪRA

(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 Teratotropesis 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. papildinājums

1. tabula.

Abinieku metamorfozes 21 dienas testa eksperimenta apstākļi

Testa dzīvnieks		*Xenopus laevis* kurkulis	
Kurkuļa sākumstadija		51. stadija pēc Nivkopa un Fābera	
Ekspozīcijas laiks		21 diena	
Kurkuļu atlases kritēriji		Attīstības stadija un kopējais garums (vēlams)	
Testa koncentrācijas		Vismaz trīs koncentrācijas, starp kurām ir atšķirība par vismaz vienu lieluma kārtu	
Ekspozīcijas režīms		Caurteces (vēlams) un/vai statiska sistēma ar periodisku ūdens nomaiņu	
Testēšanas sistēmas caurteces ātrums		25 ml/min (visu tilpumu pilnībā nomaina katrās 2,7 stundās)	
Primārie beigupunkti / noteikšanas dienas		Mirstība	Katru dienu
		Attīstības stadija	7. un 21. diena
		Pakaļējās ekstremitātes garums	7. un 21. diena
		Purna-kloākas garums	7. un 21. diena
		Ķermeņa svars	7. un 21. diena
		Vairogdziedzera histoloģija	21. diena
Atšķaidīšanas ūdens / laboratorijas kontrole		Dehlorēts krāna ūdens (filtrēts ar aktīvo ogli) vai līdzvērtīgs laboratorijā sagatavots ūdens	
Kurkuļu blīvums		20 kurkuļi uz testēšanas trauku (5 kurkuļi/litru)	
Testēšanas šķīdums / testēšanas trauks		4–10 l (10–15 cm ūdens minimums) / stikla vai nerūsējošā tērauda testēšanas trauks (piem., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikāti		4 testa replikāta trauki katrai testa koncentrācijai un kontrolgrupai	
Pieļaujamā mirstība kontrolgrupā		≤ 10 % uz vienu testa replikāta trauku	
Vairogdziedzera fiksācija	Fiksētais skaits	Visi kurkuļi (sākumā tika vērtēti 5 kurkuļi uz replikātu)	
	Ķermeņa daļa	Galva vai viss ķermenis	
	Fiksācijas šķidrums	Davidsona fiksācijas šķīdums	
Barošana	Barība	Komerciāli pieejamā barība, piem., *Sera Micron*® vai līdzvērtīga	
	Daudzums / biežums	Barošanas biežumu, izmantojot *Sera Micron*® sk. 1. tabulā	
Apgaismojums	Fotoperiods	Gaisma 12 stundas: tumsa 12 stundas	

▼**M6**

	Intensitāte	600–2 000 luksi (mērīts pie ūdens līmeņa)
Ūdens temperatūra		22° ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Izšķīdušā skābekļa (DO) koncentrācija		> 3,5 mg/l (> 40 % gaisa piesātinājums)
Laika plānojums ievācot paraugus ķīmiskajām analīzēm		Vienu reizi / reizi nedēļā (4 paraugu ņemšana uz testu)

▼M6

2. papildinājums

Jēldatu un kopsavilkuma datu pārskata tabulas

1. tabula.

Pamatinformācija par testējamo ķīmisko vielu

Ķīmiskā informācija			
	Ievadiet testējamās ķīmiskās vielas nosaukumu, koncentrācijas vienības un veikto iedarbību		
	Testējamā ķīmiskā viela:		
	Koncentrācijas vienības		
	1. apstrāde		
	2. apstrāde		
	3. apstrāde		
	4. apstrāde		
	Datums (0. diena)		Ievadiet datumu (mm/dd/gg)
	Datums (7. diena):		Ievadiet datumu (mm/dd/gg)
	Datums (21. diena):		Ievadiet datumu (mm/dd/gg)

2. tabula.

Jēldatu ievākšana 7. un 21. dienā

X. DIENA
DATUMS 00/00/00

	Koncentrācija	Apstrādes numurs	Replikāta numurs	Individuālais numurs	Individuālais identifikators	Attīstības stadija	Purnakloākas garums (mm)	Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)	Visa organisma mitrais svars (mg)
RINDA	TRT (apstrāde)	TRT#	REP (replikāts)	IND	ID#	STADIJA	BL (ķermeņa garums)	HLL (pakaļējās ekstremitātes garums)	SVARS
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**

	Koncentrācija	Apstrādes numurs	Replikāta numurs	Individuālais numurs	Individuālais identifikators	Attīstības stadija	Purnakloākas garums (mm)	Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)	Visa organisma mitrais svars (mg)
RINDA	TRT (apstrāde)	TRT#	REP (replikāts)	IND	ID#	STADIJA	BL (ķermeņa garums)	HLL (pakaļējās ekstremitātes garums)	SVARS
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**

	Koncentrācija	Apstrādes numurs	Replikāta numurs	Individuālais numurs	Individuālais identifikators	Attīstības stadija	Purnakloākas garums (mm)	Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)	Visa organisma mitrais svars (mg)
RINDA	TRT (apstrāde)	TRT#	REP (replikāts)	IND	ID#	STADIJA	BL (ķermeņa garums)	HLL (pakaļējās ekstremitātes garums)	SVARS
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**

	Koncentrācija	Apstrādes numurs	Replikāta numurs	Individuālais numurs	Individuālais identifikators	Attīstības stadija	Purnakloākas garums (mm)	Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)	Visa organisma mitrais svars (mg)
RINDA	TRT (apstrāde)	TRT#	REP (replikāts)	IND	ID#	STADIJA	BL (ķermeņa garums)	HLL (pakaļējās ekstremitātes garums)	SVARS
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**

3. tabula.

Aprēķinātie 7. un 21. dienas beigupunktu datu apkopojumi

		Attīstības stadija			Purna-kloākas garums (*SVL*, mm)		Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)		Svars (mg)	
TRT (apstrāde)	REP (replikāts)	MIN	MEDIĀNA	MAX	VIDĒJAIS	STANDARTNOVIRZE	VIDĒJAIS	STANDARTNOVIRZE	VIDEĀJIS	STANDARTNOVIRZE
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!

Piezīme: aprēķini šūnās saistīti ar datu ievadi 2. tabulā.

4. tabula.

Mirstība pa dienām

Testēšanas diena	Datums	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0.	00/00/00																
1.	#Vērtība!																
2.	#Vērtība!																
3.	#Vērtība!																
4.	#Vērtība!																
5.	#Vērtība!																

▼**M6**

Testēšanas diena	Datums	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6.	#Vērtība!																
7.	#Vērtība!																
8.	#Vērtība!																
9.	#Vērtība!																
10.	#Vērtība!																
11.	#Vērtība!																
12.	#Vērtība!																
13.	#Vērtība!																
14.	#Vērtība!																
15.	#Vērtība!																
16.	#Vērtība!																
17.	#Vērtība!																
18.	#Vērtība!																
19.	#Vērtība!																
20.	#Vērtība!																
21.	#Vērtība!																
Replikāta numurs		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Apstrādes numurs		0				0				0				0			

Piezīme: aprēķini šūnās saistīti ar datu ievadi 1. tabulā.

5. tabula.

Ūdens kvalitātes kritēriji

Ekspozīcijas sistēma (caurteces/ ar periodisku ūdens nomaiņu)
Temperatūra:
Gaismas intensitāte
Gaismas-tumsas cikls:
Barība:
Barošanas daudzums
Ūdens pH
Joda koncentrācija testēšanas ūdenī:

▼**M6**

6. tabula.

Ķīmija, datu apkopojums

Ķīmiskās vielas nosaukums:																				
CAS #:																				
Testēšanas diena	Datums	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!																				

Piezīme: aprēķini šūnās ir saistīti ar datu ievadi 1. tabulā.

▼**M6**

7. tabula.

Galvenie histoloģijas parametri, ziņojuma tabula

Datums: Ķīmiskā viela: Patologs:

Kontrolgrupas dzīvnieka ID – replikāts 1	Kontroles dzīvnieka ID – replikāts 2	Vairogdziedzera hipertrofija	Vairogdziedzera atrofija	Folikulāro šūnu hipertrofija	Folikulāro šūnu hiperplāzija
Kopā:					

Devas dzīvnieka ID – replikāts 1	Devas dzīvnieka ID – replikāts 2	Vairogdziedzera hipertrofija	Vairogdziedzera atrofija	Folikulāro šūnu hipertrofija	Folikulāro šūnu hiperplāzija
Kopā:					

Devas dzīvnieka ID – replikāts 1	Devas dzīvnieka ID – replikāts 2	Vairogdziedzera hipertrofija	Vairogdziedzera atrofija	Folikulāro šūnu hipertrofija	Folikulāro šūnu hiperplāzija
Kopā:					

Devas dzīvnieka ID – replikāts 1	Devas dzīvnieka ID – replikāts 2	Vairogdziedzera hipertrofija	Vairogdziedzera atrofija	Folikulāro šūnu hipertrofija	Folikulāro šūnu hiperplāzija
Kopā:					

▼**M6**

8. tabula.

Papildu histoloģiskie kritēriji

Datums: Ķīmiskā viela Patologs:

		Folikulārā lūmena laukuma palielināšanās	Folikulārā lūmena laukuma samazināšanās
Kontrolgrupas dzīvnieka ID – 1. replikāts			
Kontrolgrupas dzīvnieka ID – 2. replikāts			
Kopā:			

		Folikulārā lūmena laukuma palielināšanās	Folikulārā lūmena laukuma samazināšanās
Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts			
Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts			
Kopā:			

		Folikulārā lūmena laukuma palielināšanās	Folikulārā lūmena laukuma samazināšanās
Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts			
Devas dzīvnieka ID – 2. replikāts			
Kopā:			

		Folikulārā lūmena laukuma palielināšanās	Folikulārā lūmena laukuma samazināšanās
Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts			
Devas dzīvnieka ID – 2. replikāts			
Kopā:			

▼**M6**

9. tabula.

Histopatoloģisko novērojumu raksturojumi

Datums:

Ķīmiskā viela:

Patologs:

		Novērojumu raksturojums
Kontrolgrupas dzīvnieka ID – 1. replikāts		
Kontrolgrupas dzīvnieka ID – 2. replikāts		
Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts		
Devas dzīvnieka ID – 2. replikāts		

▼**M6**

Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts		
Devas dzīvnieka ID – 2. replikāts		

Devas dzīvnieka ID – 1. replikāts		
Devas dzīvnieka ID – 2. replikāts		

▼M6

10. tabula.

Tabula abinieku metamorfozes testa (AMT) x dienas (7. vai 21. diena) rezultātu apkopojumam

		Kontrolgrupa				1. deva					2. deva					3. deva				
Beigupunkts	Replikāts	Aritmētiskais vidējais	*SD* (standartnovirze)	CV	N	Aritmētiskais vidējais	SD	CV	N	p-vērtība	Aritmētiskais vidējais	SD	CV	N	p-vērtība	Aritmētiskais vidējais	SD	CV	N	p-vērtība
Pakaļējās ekstremitātes garums (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Aritmētiskais vidējais																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Aritmētiskais vidējais																			
Mitrais svars (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Aritmētiskais vidējais																			

▼M6

11. tabula.

Tabula abinieku metamorfozes testa (AMT) x dienas (7. vai 21. diena) attīstības stadijas apkopojumam

		Kontrolgrupa				1. deva					2. deva					3. deva				
	Replikāts	Mediāna	Min.	Maks.	N	Mediāna	Min.	Maks.	N	p-vērtība	Mediāna	Min.	Maks.	N	p-vērtība	Mediāna	Min.	Maks.	Mediāna	p-vērtība
Attīstības stadija	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Aritmētiskais vidējais:																			

▼M6

3. papildinājums

Alternatīvās svara un garuma analīzes gadījumā, ja vēlīnas attīstības stadija dēļ jāizslēdz vairāk nekā 20 % kurkuļu vienā vai vairākās koncentrācijās

Ja 60. attīstības stadiju pārsniegušo kurkuļu skaits ir lielāks (≥ 20 %) vienā vai vairākās nominālajās koncentrācijās, visiem kurkuļiem jāveic divfaktoru *ANOVA* ar hierarhiskās dispersijas struktūru, lai novērtētu apstrādes ar ķīmisko vielu ietekmi uz augšanu, ņemot vērā vēlīno stadiju attīstību un augšanu.

Ieteikums ir izmantot visus datus, bet ņemt vērā ietekmi uz vēlīnajām attīstības stadijām. Tas ir izdarāms ar divfaktoru *ANOVA* ar hierarhiskās dispersijas struktūru. Dzīvniekam, kurš sasniedzis 61. attīstības stadiju vai augstāku, definējiet attīstības stadiju kā *LateStage= "Yes"*. Pretējā gadījumā attīstības stadija tiek definēta kā *LateStage= "No"*. Pēc tam var veikt divfaktoru *ANOVA* ar koncentrāciju un *LateStage*, novērtējot to mijiedarbību, kā nejaušu faktoru izmantojot *Rep(Conc)* un kā citu nejaušu ietekmi – *Tadpole(Rep)*. Šādi vēl aizvien replikāts (*"rep"*) tiek analizēts kā analīzes vienība un sniedz būtībā tādus pašus rezultātus kā *rep*latestage* vidējo vērtību svērtā analīze, izsvērta pēc dzīvnieku skaita uz vidējo. Ja dati neiekļaujas *ANOVA* nepieciešamajā normalitātē vai dispersijas homogenitātē, šā šķēršļa novēršanai jāveic normalizēta sarindojuma transformācija.

Papildus *ANOVA* standarta F-testiem *Conc, LateStage* un to mijiedarbības ietekmes noteikšanai mijiedarbības F-testu var sadalīt divos papildu *ANOVA* F-testos – viens vidējām atbildes reakcijām uz koncentrācijām attiecībā uz *LateStage= "No"* un otrs vidējām atbildes koncentrācijām attiecībā uz *LateStage= "Yes"*. Turpmāka apstrādes vidējo rezultātu salīdzināšana ar kontrolgrupu tiek veikta katrā *LateStage* līmenī. Trenda tipa analīzi var veikt, lietojot piemērotus kontrastus vai vienkāršus pāru salīdzinājumus, ja ir aizdomas par *LateStage* mainīgā līmenī novērotu devas-reakcijas nemonotonitāti. Bonferoni-Holma p-vērtību korekcija jāveic vienīgi tad, ja atbilstošā F-daļa nav būtiska. Tas veicams ar *SAS* vai, ja iespējams, ar citām datu paketēm. Sarežģījumi var rasties, ja dažās koncentrācijās nav vēlīno attīstības stadiju dzīvnieku, bet šīs situācijas ir vienkārši risināmas.

▼**M6**

4. papildinājums

Definīcijas

Ķīmiska viela ir viela vai maisījums.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M6

C.39. KOLEMBOLU VAIROŠANĀS TESTS AUGSNĒ

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 232 (2009. gads). Tā izveidota, lai novērtētu ķīmisko vielu ietekmi uz augsnes kolembolu vairošanās (reproduktīvajām) sekmēm. Tā ir balstīta uz jau esošām procedūrām (1)(2). Partenoģenētiskā *Folsomia candida* un *Folsomia fimetaria*, kam raksturīga dzimumvairošanās, ir divas no vispieejamākajām kolembolu sugām, tās ir kultivējamas un komerciāli pieejamas. Gadījumos, kad šīs divas sugas nav izmantojamas specifisku biotopu pētīšanā, metode piemērojama arī citām kolembolu sugām, ja tās var izpildīt testa ticamības kritērijus.

2. Augsnē dzīvojošās kolembolas ir ekotoksikoloģiskajiem testiem piemērotas sugas. Kolembolas jeb lēcastes ir seškāji ar plānu ārskeletu, kam ir augsta gaisa un ūdens caurlaidība, tās pieder pie posmkājiem, kam salīdzinājumā ar sliekām un sīksliekām ir cits ekspozīcijas ceļš un intensitāte.

3. Daudzās sauszemes ekosistēmās augsnē un lapu nobirās kolembolu populācijas blīvums sasniedz 10^5 m^{-2} (3)(4). Pieaugušie īpatņi parasti sasniedz 0,5–5 mm garumu, to ieguldījums kopējā augsnes dzīvnieku biomasā un elpošanā ir neliels, no 1 līdz 5 % (5). Tādējādi kolembolu lielākā nozīme varētu būt kā potenciālajiem procesu regulatoriem, jo tās barojas no mikroorganismiem un mikrofaunas. Kolembolas jeb lēcastes ir plēsēji, kas pārtiek no plaša spektra endogeiskajiem un epigeiskajiem bezmugurkaulniekiem – ērcēm, simtkājiem, zirnekļiem, vabolēm un īsspārņiem. Kolembolas piedalās noārdīšanās procesos skābajās augsnēs, kur tās var būt nozīmīgākais augsnes bezmugurkaulnieks kopā ar sīksliekām, jo šeit parasti nav slieku un tūkstoškāju.

4. *F. fimetaria* ir izplatīta visā pasaulē un ir bieži sastopama dažādos augšņu tipos – sākot ar smilšainu un smilšmāla līdz *mull* un *mor* tipa augsnēm. Tā ir nepigmentēta, bezacu kolembola. Konstatēta lauksaimniecības augsnēs visā Eiropā (6). Visēdāja, tās uzturā ir gan sēņu hifas, gan baktērijas, vienšūņi un trūdvielas. Barojoties tās mijiedarbojas ar augu patogēnajām sēnēm (7) un *F. candida* gadījumā var ietekmēt mikorizas. Līdzīgi kā vairums kolembolu sugu, tā vairojas dzimumvairošanās ceļā, un olšūnu apaugļošanai ir nepieciešama pastāvīga tēviņu klātbūtne.

5. *F. candida* arī ir izplatīta visā pasaulē. Kaut arī tā nav sastopama vairumā dabisko augšņu, tā bieži lielos daudzumos atrodama trūdvielām bagātās augsnēs. Tā ir nepigmentēta, bezacu kolembola. Tai ir labi attīstīta lēcējdakša (orgāns, ko lieto lēkšanai), un tā var aktīvi skriet un lēkt, ja to iztraucē. *F. candida* ekoloģiskā nozīme ir līdzīga *F. Fimetaria* ekoloģiskajai nozīmei, bet tās biotopi ir organiskām vielām bagātākas augsnes. Vairojas partenoģenētiski. Tēviņi var būt sastopami retāk kā viens uz tūkstoti.

TESTA PRINCIPS

6. Sinhronizētas pieaugušās *(F. fimetaria)* vai juvenilās *(F. candida)* kolembolas tiek eksponētas testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju diapazonam modificētā mākslīgā augsnē (8) ar 5 % organisko vielu saturu (vai citā augsnē). Testa gaita iedalāma divos posmos:

— ja nav pieejama pietiekama informācija par toksiskumu, veic diapazona

▼M6

noteikšanas testu, kurā galvenie beigupunkti ir mirstība un vairošanās; tos nosaka *F. fimetaria* pēc 2 nedēļām un *F. candida* pēc 3 nedēļām;

— galīgajā vairošanās testā tiek noteikts pieaugušo īpatņu radītais kopējais juvenīlo īpatņu skaits un pēcnācējus radījušo īpatņu izdzīvotība. Galīgā testa ilgums ir 3 nedēļas *F. fimetaria* vai 4 nedēļas *F. candida*.

Testējamās ķīmiskās vielas toksiskā iedarbība uz pieaugušo dzīvnieku mirstību un vairošanos tiek apzīmēta ar *LCx* un *ECx*, ar nelineārās regresijas palīdzību pielāgojot datus atbilstošam modelim, lai noteiktu koncentrāciju, kas attiecīgi varētu izraisīt x % mirstību vai reproduktīvā iznākuma samazinājumu, vai alternatīvi to apzīmē kā *NOEC/LOEC* vērtību (9).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

7. Vēlams, lai būtu zināmas testējamās ķīmiskās vielas fizikālās īpašības, šķīdība ūdenī, log K_{ow}, augsnes-ūdens sadalījuma koeficients, un tvaika spiediens. Papildus vēlama informācija par testējamās vielas apriti augsnē, piem., fotolīzes, hidrolīzes un biotiskās noārdīšanās pakāpe. Ja iespējams, jādokumentē arī testējamās ķīmiskās vielas identifikācija saskaņā ar *IUPAC* nomenklatūru, *CAS* numurs, partija, laidiens, struktūrformula un tīrība.

8. Testēšanas metodi var izmantot gan ūdenī šķīstošām, gan nešķīstošām ķīmiskajām vielām. Tomēr atkarībā no testējamās vielas atšķirsies tās ievadīšana. Testēšanas metode nav izmantojama gaistošām ķīmiskajām vielām, t.i., vielām, kurām Henrija konstante vai gaisa-ūdens sadalījuma koeficients ir lielāks par vienu, vai vielām, kuru tvaika spiediens pārsniedz 0,0133 Pa pie 25 °C.

TESTA DERĪGUMS

9. Lai testu varētu uzskatīt par derīgu, tam jāatbilst šādiem kritērijiem:

— vidējā pieaugušo īpatņu mirstība testa beigās nedrīkst pārsniegt 20 %;

— juvenīlo īpatņu skaitam uz trauku testa beigās jābūt vismaz 100;

— variācijas koeficientam, kas aprēķināts juvenīlo īpatņu skaitam, jābūt mazākam par 30 % galīgā testa beigās.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

10. Ķīmiskā standartviela ir jātestē izvēlētajā augsnes tipā tās EC_{50} koncentrācijā ar regulāriem intervāliem vai arī jāiekļauj katrā testā, lai pārliecinātos, ka testa organismu atbilde testa sistēmā ir normāla līmeņa robežās. Piemērota standartviela ir borskābe, kurai vajadzētu abām sugām samazināt reprodukciju par 50 % (10)(11) apmēram 100 mg/kg augsnes saussvara.

TESTA APRAKSTS

Testēšanas trauki un aprīkojums

11. Piemēroti testēšanas trauki ir konteineri, kuros var iepildīt 30 g mitras augsnes. Trauka materiālam jābūt no stikla vai no inertas plastmasas (kas nav toksiska). Tomēr jāizvairās no plastmasas konteineru izmantošanas tad, ja ķīmiskās vielas ekspozīcija samazinās sorbcijas dēļ. Testēšanas trauku šķērsgriezuma laukumam jābūt tādam, lai traukā augsnes faktiskais dziļums

▼M6

varētu būt 2–4 cm. Testēšanas traukiem jābūt ar vākiem (piem., stikla vai polietilēna), kuru konstrukcija samazina ūdens iztvaikošanu, vienlaikus pieļaujot gāzu apmaiņu starp augsni un atmosfēru. Konteineram vismaz daļēji jābūt caurspīdīgam, lai tas būtu gaismas caurlaidīgs.

12. Nepieciešams parastais laboratorijas aprīkojums, kurā noteikti ietilpst:

— žāvēšanas skapis;

— stereomikroskops;

— pH metrs un luksometrs;

— piemēroti precīzi svari;

— temperatūras kontrolei piemērots aprīkojums;

— mitruma kontrolei piemērots aprīkojums (nav obligāts, ja ekspozīcijas trauki aizvērti ar vākiem);

— inkubators vai neliela istaba ar kontrolētu temperatūru;

— knaibles vai lēnas iesūkšanas gaisa plūsmas ierīce.

Testa augsnes sagatavošana

13. Izmanto pārveidotu mākslīgo augsni (8) ar organisko vielu saturu 5 %. Var izmantot arī dabisku augsni, ja mākslīgā augsne nelīdzinās dabiskajai augsnei. Ieteicamais mākslīgās augsnes sastāvs (saussvars, žāvēta 105 °C līdz konstantam svaram):

— 5 % gaissausas un smalki samaltas sfagnu kūdras (pieļaujams daļiņu izmērs līdz 2 ± 1 mm);

— 20 % kaolīna māla (kaolinīta saturs vēlams virs 30 %);

— apmēram 74 % gaissausas rūpnieciskas smilts (daudzums atkarīgs no nepieciešamā $CaCO_3$ daudzuma), pārsvarā tās sastāvā ir smalka smilts, kurā vairāk nekā 50 % daļiņu ir 50 līdz 200 mikronus lielas. Precīzs smilšu daudzums atkarīgs no $CaCO_3$ satura (sk. turpmāk), kopā jābūt ne vairāk kā 75 %;

— 1,0 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$, pulverizēts, analītiskās tīrības pakāpes), lai sasniegtu pH 6,0 ± 0,5; pievienojamā kalcija karbonāta daudzums galvenokārt atkarīgs no kūdras kvalitātes/rakstura (sk. 1. piezīmi).

1. piezīme: nepieciešamā $CaCO_3$ daudzums būs atkarīgs no augsnes substrāta sastāvdaļām, un tas jānosaka, mērot pH apakšparaugos tieši pirms testa, mitrā pirmsinkubācijas augsnē.*2. piezīme*: ieteicams noteikt pH un neobligāti arī C/N attiecību, katjonu apmaiņas kapacitāti *(CEC)* un organisko vielu saturu augsnē, lai padarītu iespējamu normalizāciju vēlākajās stadijās un labāku rezultātu interpretēšanu.*3. piezīme:* ja nepieciešams, piem., specifiskiem testēšanas nolūkiem, par testa un/vai kontrolgrupas substrātu var izmantot dabiskas augsnes no nepiesārņotām teritorijām. Taču, ja lieto dabisku augsni, tai jābūt brīvai no piesārņojuma, un ir jāraksturo vismaz tās izcelšanās (ņemšanas) vieta, pH, struktūra (daļiņu lieluma sadalījums), *CEC* un organisko vielu saturs. Dabiskām augsnēm ir ieteicams noskaidrot to piemērotību testam un testa derīguma kritēriju sasniegšanai pirms augsnes izmantošanas galīgā testā.

▼M6

14. Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi sajauc (piem., lielā laboratorijas maisītājā). Mākslīgās augsnes maksimālo ūdensnoturētspēju *(WHC)* noskaidro saskaņā ar 5. papildinājumā aprakstītajām procedūrām. Testējamās augsnes mitruma saturs ir jāoptimizē, lai iegūtu irdenu porainu augsni, kuras struktūra ļauj kolembolām nokļūt porās. Parasti tas ir 40–60 % no maksimālās ūdensnoturētspējas.

15. Lai līdzsvarotu/stabilizētu augsnes skābumu, sausā mākslīgā augsne 2–7 dienas pirms testa jāsamitrina, pievienojot dejonizētu ūdeni tik daudz, lai sasniegtu apmēram pusi no testa sākumā nepieciešamā kopējā ūdens daudzuma. pH noteikšanai izmanto augsnes maisījumu un 1 M kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma attiecībā 1:5 (saskaņā ar 6. papildinājumu). Ja augsne ir skābāka par nepieciešamo skābuma diapazonu, to var koriģēt, pievienojot atbilstošu $CaCO_3$ daudzumu. Ja augsne ir pārāk bāziska, to var koriģēt, pievienojot kolembolām nekaitīgu neorganisko skābi.

16. Iepriekš samitrinātā augsne tiek sadalīta daļās atbilstoši testa koncentrāciju (un ķīmisko standartvielu, ja nepieciešams) un testā izmantoto kontrolgrupu skaitam. Testējamās ķīmiskās vielas pievienošana un ūdens satura regulēšana notiek saskaņā ar 24. punktu.

Testējamo dzīvnieku atlase un sagatavošana

17. Ieteicamākā suga ir partenoģenētiskā *F. candida*, jo starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (11) šī suga biežāk nekā *F. fimetaria* atbilda ar izdzīvotību saistītajiem derīguma kritērijiem. Ja izmanto citas sugas, tām jāatbilst 9. punktā aprakstītajiem ticamības kritērijiem. Testa sākumā dzīvniekiem jābūt labi pabarotiem; vēlamais vecums ir 23–26 dienas *F. fimetaria* un 9–12 dienas *F. candida*. Katrā replikātā jābūt 10 *F. fimetaria* tēviņiem un 10 mātītēm, un 10 *F. candida* mātītēm (sk. 2. un 3. papildinājumu). Pēc nejaušības principa no traukiem atlasa sinhronizētus dzīvniekus, un veselību un fizisko stāvokli pārbauda katrai grupai, kas tiek pievienota replikātam. Katra 10/20 īpatņu lielā grupa tiek ielikta nejauši izvēlētā testēšanas konteinerā; ieteicams izvēlēties lielas *F. fimetaria* mātītes, lai nodrošinātu to atšķiršanu no *F. fimetaria* tēviņiem.

Testa koncentrāciju sagatavošana

18. Testējamās ķīmiskās vielas iestrādei augsnē var izmantot četras metodes: 1) testējamās ķīmiskās vielas iejaukšana augsnē ar ūdeni kā nesēju, 2) testējamās ķīmiskās vielas iejaukšana augsnē ar organisko šķīdinātāju kā nesēju, 3) testējamās ķīmiskās vielas iemaisīšana augsnē ar smiltīm kā nesēju, 4) testējamās ķīmiskās vielas izkliedēšana uz augsnes virskārtas. Piemērotākās metodes izvēle atkarīga no ķīmiskās vielas raksturlielumiem un testa mērķa. Pamatā ieteicama testējamās vielas iejaukšana augsnē. Tomēr var būt arī nepieciešamas ķīmiskās vielas ievadīšanas metodes, kas atbilst ķīmiskās vielas praktiskajam izmantojumam (piem., šķidro preparātu izsmidzināšana vai īpašu pesticīdu preparātu, piem. granulu vai sēklu pārklājumu, izmantošana). Augsni apstrādā pirms kolembolu pievienošanas, izņemot gadījumus, kad testējamā ķīmiskā viela tiek izkliedēta augsnes virskārtā, tad kolembolām ļauj vispirms iekļūt augsnē.

Ūdenī šķīstoša testējamā ķīmiskā viela

19. Testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu pagatavo dejonizētā ūdenī tādā daudzumā, kas ir pietiekams vienas testa koncentrācijas visiem replikātiem. Pirms iepildīšanas testēšanas traukā katru testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu rūpīgi samaisa ar vienu iepriekš samitrinātas augsnes porciju.

Ūdenī nešķīstoša testējamā ķīmiskā viela

20. Vielām, kas nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskajos šķīdinātājos, testējamo ķīmisko vielu var izšķīdināt mazākajā iespējamajā piemērota organiskā šķīdinātāja (piem., acetona) daudzumā, kas nodrošina ķīmiskās vielas pienācīgu iejaukšanu augsnē un nepieciešamo sajaukšanos ar kvarca smilti. Jālieto tikai

▼M6

gaistoši šķīdinātāji. Ja izmanto organisko šķīdinātāju, visām testa koncentrācijām un šķīduma negatīvajai papildu kontrolgrupai jāsatur vienāds minimālais šķīdinātāja daudzums. Apstrādes konteineri uz zināmu laiku jāatstāj neapsegti, lai ar testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu saistītais šķīdinātājs varētu iztvaikot, vienlaikus nodrošinot, ka nenotiek testējamās ķīmiskās viela disipācija.

Testējamās ķīmiskās vielas, kas slikti šķīst ūdenī un organiskajos šķīdinātājos

21. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām, kas slikti šķīst ūdenī un organiskajos šķīdinātājos, kvarca smiltis, kurām jābūt augsnei pievienoto smilšu sastāvā, sajauc ar tādu testējamās ķīmiskās vielas daudzumu, kas vajadzīgs, lai iegūtu nepieciešamo testa koncentrāciju. Kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātai augsnei un pēc tam, kad ir pievienots atbilstošs daudzums dejonizēta ūdens, iegūstot nepieciešamo mitruma saturu, to rūpīgi izmaisa. Iegūto maisījumu sadala starp testēšanas traukiem. Procedūru atkārto katrai testa koncentrācijai, un sagatavo arī atbilstošu kontrolgrupu.

Testējamās ķīmiskās vielas izkliedēšana uz augsnes virskārtas

22. Ja testējamā ķīmiskā viela ir pesticīds, var būt lietderīgi to izsmidzināt uz augsnes virskārtas. Augsni apstrādā pēc kolembolu pievienošanas. Testēšanas konteinerus vispirms piepilda ar samitrinātu augsnes substrātu, tad ielaiž dzīvniekus, un pēc tam testēšanas konteinerus nosver. Lai izvairītos no dzīvnieku tiešas eksponētības testējamajai vielai tieša kontakta ceļā, testējamo vielu lieto vismaz pusstundu pēc kolembolu ielaišanas. Testējamā ķīmiskā viela jāizkliedē augsnes virskārtā iespējami vienmērīgi, izmantojot piemērotu laboratorijas mēroga izsmidzināšanas ierīci, kas simulē izsmidzināšanu uz lauka. Apstrāde jāveic temperatūrā, kuras svārstības nepārsiedz ± 2 °C, un ūdens šķīdumu, emulsiju, ūdens dispersiju izkliedēšanas ātrumam jāatbilst riska novērtēšanas ieteikumiem. Ātrums jāpārbauda, izmantojot piemērotu kalibrācijas tehniku. Īpašus preparātus, piem., granulas vai sēklu pārklājumus, var lietot veidā, kas atbilst to lietošanai lauksaimniecībā. Barību pievieno pēc izsmidzināšanas.

PROCEDŪRA

Testēšanas apstākļi

23. Testa vidējai temperatūrai jābūt 20 ± 1 °C, temperatūras diapazons 20 ± 2 °C. Testu veic kontrolētos gaismas-tumsas ciklu apstākļos (vēlamas 12 stundas gaismas un 12 stundas tumsas) ar 400 līdz 800 luksu apgaismojumu testēšanas trauku tuvumā.

24. Lai pārbaudītu augsnes mitrumu, traukus nosver testa sākumā, vidū un beigās. Ja svara zudums ir > 2 %, to papildina, pievienojot dejonizētu ūdeni. Jāņem vērā, ka ūdens zudumu var mazināt, uzturot augstu gaisa mitrumu (> 80 %) testa inkubatorā.

25. pH jāmēra gan diapazona noteikšanas testa, gan galīgā testa sākumā un beigās. Mērījumi jāveic vienā papildu kontrolgrupas paraugā un vienā papildu paraugā no katra apstrādātās augsnes parauga (visām koncentrācijām); papildu paraugus jāsagatavo un jāapstrādā līdzīgi kā testējamās kultūras, bet tiem nepievieno kolembolas.

Testa procedūra un mērījumi

26. Katrai testa koncentrācijai testēšanas traukā ievieto augsnes daudzumu, kas atbilst 30 g svaigas augsnes. Sagatavo arī ūdens kontrolgrupas bez testējamās ķīmiskās vielas. Ja ķīmiskās vielas ievadīšanai lieto nesējvielu, papildus testa

▼M6

sērijām jāiekārto arī viena testa sērija ar nesējvielu vienu pašu. Šķīdinātāja vai izkliedētāja koncentrācijai jābūt tādai pašai kā testējamo ķīmisko vielu saturošajos testēšanas traukos.

27. Kolembolas pa vienai uzmanīgi ievieto katrā testēšanas traukā (pēc nejaušības principa) un noliek uz augsnes virskārtas. Dzīvnieku sekmīgai pārnešanai var izmantot gaisa plūsmas ierīces ar zemu iesūkšanas intensitāti. Replikātu skaits katrai testa koncentrācijai un kontrolgrupai ir atkarīgs no izmantotā testēšanas plāna. Testēšanas traukus izvieto testa inkubatorā pēc nejaušības principa, un šo izvietojumu pēc nejaušības principa maina reizi nedēļā.

28. *F. fimetaria* testam uz katru testēšanas trauku jālieto divdesmit pieauguši īpatņi (23–26 dienas veci) – 10 mātītes un 10 tēviņi. Testa 21. dienā kolembolas ekstrahē no augsnes un saskaita. Sinhronizētā testa dzīvnieku grupā *F. fimetaria* dzimumu var noteikt pēc to lieluma. Mātītes ir redzami lielākas nekā tēviņi (sk. 3. papildinājumu).

29. *F. candida* testam izmantojami desmit 9–12 dienas veci juvenīlie īpatņi uz vienu testēšanas trauku. Testa 28. dienā kolembolas ekstrahē no augsnes un saskaita.

30. Testa sākumā un apmēram pēc divām nedēļām kā barības avotu katrā konteinerā pietiekamā daudzumā (t.i. 2–10 mg) ieliek granulētu žāvētu maizes raugu, kas komerciāli pieejams izmantošanai mājsaimniecībās.

31. Testa beigās novēro mirstību un vairošanos. Pēc trim nedēļām *(F. fimetaria)* vai četrām nedēļām *(F. candida)* kolembolas ekstrahē no testa augsnes (sk. 4. papildinājumu) un saskaita (12). Ja kolembola netiek ekstrahēta, to reģistrē kā mirušu. Ekstrakcijas un skaitīšanas metodes ir jāvalidē. Par validētu ekstrakcijas metodi atzīstama tāda, ar kuru var ekstrahēt vairāk nekā 95 % juvenīlo īpatņu, t.i. pievienojot augsnei konkrētu skaitu.

32. Testa procedūras praktisks kopsavilkums un grafiks aprakstīts 2. papildinājumā.

Testa plāns

Diapazona noteikšanas tests

33. Ja nepieciešams, diapazona noteikšanas testu veic, piem., ar piecām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām: 0,1, 1,0, 10, 100 un 1 000 mg/kg saussvara augsnes, kā arī ar katras apstrādes un kontrolgrupas diviem replikātiem. Izvēloties koncentrāciju diapazonu diapazona noteikšanas testam, var izmantot papildu informāciju no testiem ar līdzīgām ķīmiskajām vielām, vai pieejamo literatūru par kolembolu mirstību vai vairošanos.

34. Diapazona noteikšanas testa ilgums ir divas nedēļas *F. fimetaria* un trīs nedēļas *F. candida*, tas atbilst vienas jaunas paaudzes attīstības laikam. Testa beigās novērtē kolembolu mirstību un vairošanos. Ir jāreģistrē pieaugušo īpatņu skaits un juvenīlo īpatņu sastopamība.

Galīgais tests

35. Lai noteiktu *ECx* (piem., EC_{10}, EC_{50}), jātestē 12 koncentrācijas. Ieteicami vismaz divi replikāti apstrādei ar katru testa koncentrāciju un seši kontrolgrupas replikāti. Atstarpes koeficients var variēt atkarībā no devas-reakcijas modeļa.

▼M6

36. *NOEC/LOEC* noteikšanai jātestē vismaz piecas koncentrācijas ģeometriskās sērijās. Katrai testa koncentrācijai ieteicami četri replikāti, kā arī astoņas kontrolgrupas. Atstarpes koeficients starp blakus esošām testa koncentrācijām nedrīkst pārsniegt 1,8.

37. Kombinēta pieeja ļauj reizē noteikt gan *NOEC/LOEC*, gan *ECx*. Šai kombinētajai pieejai izmanto astoņas apstrādes koncentrācijas ģeometriskās sērijās. Ieteicami katras apstrādes četri replikāti un astoņas kontrolgrupas. Atstarpes koeficients starp blakus esošām testa koncentrācijām nedrīkst pārsniegt 1,8.

38. Ja diapazona noteikšanas testā netiek konstatēta augstākās koncentrācijas (piem., 1 000 mg/kg) ietekme, vairošanās testu var veikt kā pieļaujamā daudzuma testu, izmantojot testa koncentrāciju 1 000 mg/kg un kontrolgrupu. Pieļaujamā daudzuma tests sniegs iespēju pierādīt, ka robežkoncentrācijai nav statistiski būtiskas ietekmes. Gan apstrādātajai augsnei, gan kontrolgrupai izmanto astoņus replikātus.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

39. Vairošanās sekmes ir galvenais testa beigpunkts (piem., radušos juvenīlo īpatņu skaits uz testēšanas trauku). Statistiskās analīzes, piem. *ANOVA* procedūras, salīdzina apstrādes variantus ar Stjūdenta t-testu, Daneta testu vai Viljamsa testu. 95 % ticamības intervālu aprēķina individuālo apstrāžu vidējiem rādītājiem.

40. Izdzīvojušo pieaugušo īpatņu skaits neapstrādātajās kontrolgrupās ir galvenais derīguma kritērijs, un tas ir jādokumentē. Līdzīgi kā diapazona noteikšanas testā, visas kaitīgās iedarbības pazīmes jāapraksta arī galīgajā pārskatā.

LC_x un EC_x

41. EC_x vērtības, tostarp ar tām saistīto zemāko un augstāko 95 % ticamības robežu parametram, aprēķina, izmantojot piemērotas statistikas metodes (piem., logistisko vai Veibula funkciju, saīsināto Spīrmena-Kārbera metodi vai vienkāršu interpolāciju). *ECx* iegūst, kontrolgrupas vidējā rādītāja x % atbilstošo vērtību ievietojot atrastajā vienādojumā. Lai aprēķinātu EC_{50} vai jebkuru citu *ECx*, visai datu kopai jāveic regresijas analīze. LC_{50} parasti nosaka ar varbūtības vienības analīzi vai līdzīgu analīzi, kas ņem vērā binomiāli sadalītus mirstības datus.

NOEC/LOEC

42. Ja statistiskās analīzes nolūks ir noteikt *NOEC/LOEC*, nepieciešama statistika par katru testēšanas trauku (atsevišķie trauki tiek uzskatīti par replikātiem). Jāizmanto piemērotas statistikas metodes saskaņā ar ESAO 54. dokumentu "Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi" (9). Parasti tiek analizēta testējamās ķīmiskas vielas nelabvēlīgā ietekme salīdzinājumā ar kontrolgrupu, izmantojot vienpusējās hipotēzes testu ar $p \leq 0,05$.

43. Normālo sadalījumu un dispersijas homogenitāti var testēt ar piemērotu statistikas testu, piem., attiecīgi Šapiro-Vilka testu un Lēvena testu ($p \leq 0,05$). Var izmantot vienvirziena dispersijas analīzi (*ANOVA*) un turpmākus daudzfaktoru salīdzināšanas testus. Daudzfaktoru salīdzinājumus (piem.,

▼M6

Daneta testu) vai descendentus trenda testus (piem., Viljamsa testu) var izmantot, lai aprēķinātu, vai ir statistiski būtiskas atšķirības ($p \leq 0,05$) starp kontrolgrupām un dažādajām testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām (ieteicamā testa izvēle saskaņā ar ESAO 54. dokumentu (9)). Vēl *NOEC* un *LOEC* noteikšanai izmantojamas neparametriskās metodes (piem., Bonferoni U-tests saskaņā ar Holma vai Džonkhīra-Terpstra trenda testu).

Pieļaujamā daudzuma tests

44. Ja ir veikts pieļaujamā daudzuma tests (salīdzinājums starp kontrolgrupu un tikai vienu apstrādi) un ir izpildīti parametrisko testu procedūru priekšnoteikumi (normalitāte, homogenitāte), metriskās atbildes analizē, izmantojot Stjūdenta testu (t-testu). Ja šīs prasības nav izpildītas, var izmantot nevienlīdzīgās dispersijas t-testu (Velča t-testu) vai neparametrisku testu (piem., Manna-Vitnija U-testu).

45. Lai noteiktu būtiskās atšķirības starp kontrolgrupām (kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu), katras kontrolgrupas replikātus var testēt tāpat, kā aprakstīts attiecībā uz pieļaujamā daudzuma testu. Ja šie testi neparāda būtiskas atšķirības, visus kontrolgrupas un šķīdinātāja kontrolgrupas replikātus var apvienot. Alternatīva ir visus apstrādes replikātus salīdzināt ar šķīdinātāja kontrolgrupu.

Testēšanas pārskats

46. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— testējamās ķīmiskās vielas identitāte, partija, sērija un *CAS* numurs, tīrība;

— testējamās ķīmiskās vielas fizikāli ķīmiskās īpašības (piem., log K*ow*, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, Henrija konstante (H), un vēlama informācija par testējamās ķīmiskās vielas apriti augsnē), ja pieejama;

— ja netiek testēta tīra ķīmiskā viela, jānorāda tās forma un piedevas.

Testa organismi:

— sugas identifikācija, testa organismu piegādātājs, audzēšanas apstākļu apraksts un testa organismu vecuma diapazons.

Testēšanas apstākļi:

— eksperimenta plāna un procedūras apraksts;

— informācija par testa augsnes sagatavošanu; detalizēts apraksts dabiskas augsnes lietošanas gadījumā (izcelsme, vēsture, daļiņu lielums un sadalījums, pH, organisko vielu saturs);

— augsnes ūdensnoturētspēja;

— testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas augsnei paņēmiena apraksts;

— testēšanas apstākļi: gaismas intensitāte, gaismas-tumsas ciklu ilgums, temperatūra;

— barošanas režīma apraksts, testā izmantotās barības veids un daudzums, barošanas datumi;

— pH un ūdens saturs augsnē testa sākumā un beigās (kontrolgrupa un katra apstrāde);

— detalizēts ekstrakcijas metodes un ekstrakcijas efektivitātes apraksts.

▼**M6**

Testa rezultāti:

— katrā testēšanas traukā noteikto juvenīlo īpatņu skaits testa beigās;

— pieaugušo īpatņu skaits un mirstība (%) katrā testēšanas traukā testa beigās;

— acīmredzamo fizioloģisku vai patoloģisku simptomu vai izteiktu uzvedības pārmaiņu apraksts;

— rezultāti, kas iegūti ar testējamo ķīmisko standartvielu;

— *NOEC/LOEC* vērtības, mirstības LC_x un vairošanās EC_x (galvenokārt LC_{50}, LC_{10}, EC_{50}, un EC_{10}), kopā ar 95 % ticamības intervāliem. Aprēķiniem izmantotā pielāgotā modeļa grafiks, tā funkcijas vienādojums un parametri (sk. (9));

— visa informācija un novērojumi, kas varētu būt noderīgi rezultātu interpretācijā;

— faktiskā testa jauda, ja veikts hipotēzes tests (9);

— atkāpes no šajā testēšanas metodē aprakstītajām procedūrām un neparasti novērojumi testa laikā;

— testa derīgums;

— attiecībā uz *NOEC* rādītājam, ja tas noteikts, – minimālā detektējamā atšķirība.

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.36. nodaļa: Plēsējērces (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) vairošanās tests augsnē.

(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. papildinājums

Definīcijas

Aprakstītajai testēšanas metodei izmantojamas šādas definīcijas (šai testā visas ietekmes koncentrācijas tiek izteiktas kā testējamās ķīmiskās vielas masa uz testa augsnes sauso masu).

Ķīmiskā viela ir viela vai maisījums.

NOEC **(nenovērojamās ietekmes koncentrācija)** ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, pie kuras nav novērojama ietekme. Šajā testā koncentrācijai, kas atbilst *NOEC*, nav statistiski būtiskas ietekmes ($p < 0,05$) definētā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

LOEC **(zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija**) ir zemākā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kurai ir statistiski būtiska ietekme ($p < 0,05$) definētā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontrolgrupu.

ECx **(x % ietekmes koncentrācija)** ir koncentrācija, kas izraisa x % ietekmi uz testa organismiem definētā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontrolgrupu. Piem., EC_{50} ir koncentrācija, kas testa beigupunktā novērtēta kā ietekmi izraisoša 50 % no eksponētās populācijas definēta ekspozīcijas perioda laikā.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Kolembolu testa galvenās darbības un laika grafiks

Testa galvenie posmi ir šādi:

Laiks (diena)	Darbība
– 23 līdz – 26	Sinhronizētas *F. fimetaria* kultūras sagatavošana
-14	Mākslīgās augsnes sagatavošana (sajaucot sausās sastāvdaļas) Mākslīgās augsnes pH pārbaude un attiecīgi pielāgojumi Augsnes maksimālās ūdensnoturētspējas (*WHC*) mērījumi
– 9 līdz – 12	Sinhronizētas *F. candida* kultūras sagatavošana
– 2 līdz – 7	Iepriekšēja augsnes mitrināšana
– 1	Juvenīlo īpatņu sadalīšana partijās Izejšķīdumu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas pievienošana, ja nepieciešams šķīdinātājs.
0	Izejšķīdumu sagatavošana un testējamo ķīmisko vielu pievienošana, ja plānota cietas vai ūdenī šķīstošas ķīmiskās vielas pievienošana vai izkliedēšana uz virskārtas. Augsnes pH mērījumi un konteineru svēršana. Barības ievietošana. Kolembolu ievietošana tvertnēs.
14	*F. fimetaria* diapazona noteikšanas tests: testa pabeigšana, dzīvnieku ekstrahēšana, pH un ūdens zuduma (pēc svara) mērīšana. Galīgie testi: mitruma satura noteikšana, papildināšana ar ūdeni un 2–10 mg rauga pievienošana.
21	Galīgais *F. fimetaria* tests: testa pabeigšana, dzīvnieku ekstrahēšana, augsnes pH un ūdens zuduma (pēc svara) mērīšana. *F. candida* diapazona noteikšanas tests: testa pabeigšana, dzīvnieku ekstrahēšana, pH un ūdens zuduma (pēc svara) mērīšana.
28	Galīgais *F. candida* tests: testa pabeigšana, dzīvnieku ekstrahēšana, pH un ūdens zuduma (pēc svara) mērīšana.

▼M6

3. papildinājums

Norādījumi *F. fimetaria* un *F. candida* audzēšanai un sinhronizēšanai

Šajos norādījumos sniegtais laiks un ilgums jāpārbauda katram kolembolu celmam atsevišķi, lai nodrošinātu, ka laika grafiks ļaus pietiekami sinhronizēt juvenīlos īpatņus. Piemērota diena oliņu savākšanai un sinhronu juvenīlo īpatņu savākšanai ir tad, kad pēc pieaugušo īpatņu pārvietošanas uz svaigu substrātu ir notikusi oliņu dēšana un izšķilšanās.

Ieteicams iekārtot permanentu dzīvnieku pamatkultūru, piem., ar 50 konteineriem/Petri platēm. Pamatkultūrai ir jāuztur labi barošanas apstākļi ar barošanu reizi nedēļā, ūdens pievienošanu un vecās barības un mirstīgo atlieku aizvākšanu. Ja uz substrāta būs pārāk maz kolembolu, tas var radīt attīstības kavēšanos palielinātas sēņu augšanas dēļ. Ja pamatkultūru pārāk bieži lieto oliņu ražošanai, kultūra var nolietoties. Kultūras nolietojuma pazīmes ir miruši dzīvnieki un pelējums uz substrāta. Kultūras atjaunošanai var izmantot oliņas, kas palikušas no sinhronizēto dzīvnieku audzēšanas.

Sinhronizētajā *F. fimetaria* kultūrā mātītes atšķir no tēviņiem vispirms pēc izmēra. Tēviņi ir redzami mazāki nekā mātītes, un tēviņu iešanas ātrums ir lielāks nekā mātītēm. Pareiza dzimuma noteikšana prasa nelielu pieredzi un to var apstiprināt ar ģenitāliju rajona mikroskopisku pārbaudi (13).

1. **Turēšana**

1.a. *Kultivēšanas substrāta sagatavošana*

Kultivēšanas substrāts ir ģipsis (kalcija sulfāts) ar aktivēto ogli. Šāds substrāts ir mitrs, un ogle absorbē atkritumu gāzes un izdalījumus (14)(15). Kolembolu novērošanas sekmēšanai var izmantot dažādas ogļu formas. Piem., *F. candida* un *F. fimetaria* kultūrās tiek lietota pulverveida ogle (kas veido pelēku/melnu kalcija sulfāta jeb ģipša slāni).

Substrāta sastāvdaļas:

— 20 ml aktivētās ogles;

— 200 ml destilēta ūdens;

— 200 ml kalcija sulfāta

vai

— 50 g aktivētās pulverveida ogles;

— 260–300 ml destilēta ūdens;

— 400 g kalcija sulfāta.

Substrāta maisījumam pirms lietošanas ļauj nostāvēties.

1.b. *Vairošanās*

Kolembolas tur konteineros, piem., Petri platēs (90 mm × 13 mm), kuru apakša klāta ar 0,5 cm biezu ģipša un ogles substrāta slāni. Tās kultivē 20 ± 1 °C temperatūrā 12–12 stundu gaismas/tumsas ciklā (400–800 luksi). Konteinerus visu laiku tur mitrus, lai nodrošinātu, ka gaisa relatīvais mitrums konteineros ir 100 %. To panāk ar brīva ūdens klātbūtni porainajā

▼M6

ģipsī, taču jāvairās no ūdens plēves rašanās ģipša virskārtā. No ūdens zuduma var izvairīties, nodrošinot mitru gaisu telpā. Visi mirušie īpatņi ir jāizņem no konteineriem, tāpat arī sabojājusies barība. Lai stimulētu oliņu ražošanu, nepieciešams pieaugušos dzīvniekus pārnest uz Petri platēm ar svaigi sagatavotu ģipša/ogles substrātu.

1.c. *Barības avots*

Granulētu sauso pārtikas raugu lieto kā vienīgo barības avotu gan *F. candida,* gan *F. fimetaria*. Lai izvairītos no pelējuma, svaigu barību nodrošina vienreiz vai divreiz nedēļā. To novieto tieši uz ģipša slāņa mazā kaudzītē. Pārtikas rauga daudzumu pielāgo kolembolu populācijas lielumam, bet parasti 2–15 mg ir pietiekams daudzums.

2. **Sinhronizācija**

Tests jāveic ar sinhronizētiem dzīvniekiem, lai iegūtu homogēnus, vienādas attīstības stadijas un izmēra testa dzīvniekus. Turklāt sinhronizācija, pamatojoties uz seksuālo dimorfismu, t.i. izmēra atšķirībām, ļauj diferencēt *F. fimetaria* mātītes un tēviņus no trīs nedēļu vecuma un vēlāk. Turpmāk ieteikta procedūra sinhronizētu dzīvnieku iegūšanai (praktiskie soļi ir pēc izvēles).

2.a. *Sinhronizācija*

— Sagatavo konteinerus ar 0,5 cm biezu ģipša/ogles substrāta slāni.

— Oliņu dēšanai ievāc 150–200 pieaugušus *F. fimetaria* un 50–100 *F. candida* īpatņus no labākajiem 15–20 pamatkultūras konteineriem, kuros ir 4–8 nedēļas vecs substrāts; tos pārvieto uz konteineriem un pabaro ar 15 mg pārtikas rauga. Jāizvairās no juvenīlo īpatņu likšanas kopā ar pieaugušajiem, jo to klātbūtne var inhibēt oliņu ražošanu.

— Kultūrā jāuztur 20 ± 1 °C temperatūra (vidēji jābūt 20 °C) un 12–12 stundu gaismas-tumsas cikls (400–800 luksi). Jānodrošina svaigas pārtikas pieejamība un ar mitrumu piesātināts gaiss. Barības trūkums var izraisīt dzīvnieku defekāciju uz oliņām, kas savukārt izraisīs sēņu augšanu uz oliņām, kā arī *F. candida* var apēst savas oliņas. Pēc 10 dienām oliņas rūpīgi savāc ar adatu vai lāpstiņu un pārvieto uz "oliņu papīru" (nelieli filtrpapīra gabaliņi iemērkti ģipša vai ģipša/ogles šķidrā maisījumā), kas tiek novietots konteinerā ar svaigu ģipša/ogles substrātu. Uz substrāta tiek nolikti daži rauga graudiņi, lai piesaistītu juvenīlos īpatņus un panāktu, ka viņi pārvietojas uz oliņu papīru. Svarīgi, lai oliņu papīrs un substrāts ir mitri, jo citādi oliņas dehidratēsies. Alternatīva ir pieaugušos dzīvniekus uz divām vai trim dienām aizvākt no sinhronizācijas kultūru kastēm pēc tam, kad tie ir dējuši oliņas.

— Pēc trim dienām vairums oliņu uz oliņu papīra ir izšķīlušās, un daži juvenīlie īpatņi ir atrodami zem oliņu papīra.

— Lai iegūtu vienāda vecuma juvenīlos īpatņus, oliņu papīrs ar oliņām, kas nav izšķīlušās, tiek aizvākts no Petri plates ar pincetes palīdzību. Juvenīlie īpatņi, kas tagad ir 0–3 dienas veci, paliek traukā un tiek baroti ar pārtikas raugu. Neizšķīlušās oliņas tiek aizvāktas.

— Oliņas un izšķīlušos juvenīlos īpatņus kultivē tādos pašos apstākļos kā pieaugušos. Jo īpaši attiecībā uz *F. fimetaria* jāveic šādi pasākumi: jānodrošina pietiekams svaigas barības daudzums, vecā sabojājusies barība jāaizvāc, pēc vienas nedēļas juvenīlie īpatņi jāpārvieto jaunās Petri platēs, nodrošinot blīvumu virs 200.

▼M6

2.b. *Darbības ar kolembolām testa sākumā*

— 9–12 dienas vecas *F. candida* vai 23–26 dienas vecas *F. fimetaria* tiek ievāktas, piem., ar iesūkšanu, un izlaistas nelielā konteinerā ar mitru ģipša/ogles substrātu, un to fiziskais stāvoklis tiek novērtēts ar binokulāro mikroskopu (ievainoti un traumēti dzīvnieki tiek aizvākti). Lai izvairītos no sausuma stresa, visas darbības veicamas kolembolām atrodoties mitrā gaisā, piem., samitrinot virsmas.

— Konteineru apgriež ar apakšu uz augšu un uzsit pa to, lai kolembolas pārvietotu uz augsni. Jāneitralizē statiskās elektrības ietekme, citādi dzīvnieki var aizlidot pa gaisu vai pielipt pie testēšanas konteinera sienām un izžūt. Neitralizēšanai izmantojams jonizētājs vai zem trauciņa palikts mitrs audums.

— Barība jāizkliedē pa visu augsnes virskārtu un nevis jāatstāj vienā gabalā.

— Transportēšanas un testēšanas perioda laikā jāuzmanās, lai testa konteineri netiktu dauzīti un citādi fiziski traucēti, jo šādas darbības var palielināt augsnes sablīvēšanos un traucēt kolembolu mijiedarbību.

3. **Alternatīvās kolembolu sugas**

Testēšanai ar šo testēšanas metodi var izmantot arī tādas kolembolu sugas kā *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta*. Pirms citu sugu izmantošanas ir jābūt izpildītiem vairākiem priekšnoteikumiem:

— suga ir nepārprotami identificēta;

— tiek sniegts loģisks pamatojums sugas izvēlei;

— tiek nodrošināts, ka to reproduktīvā bioloģija iekļaujas testēšanas fāzē, jo tas ir potenciālais mērķis ekspozīcijas laikā;

— ir zināms to dzīves cikls: nobriešanas laiks, oliņu attīstības ilgums un ekspozīcijai pakļautās attīstības stadijas;

— ar testa substrātu un barības padevi ir nodrošināti optimāli augšanas un vairošanās apstākļi;

— lai varētu veikt precīzu toksicitātes novērtējumu, variācijām (starp īpatņiem) jābūt pietiekami zemām.

▼M6

4. papildinājums

Dzīvnieku ekstrakcija un skaitīšana

1. **Var izmantot divas ekstrakcijas metodes**

1.a. Pirmā metode: izmanto kontrolētas temperatūras gradienta ekstrakcijas aparātu, kas darbojas pēc Makfadjena izstrādātajiem principiem (1). Ekstrakcijas kastes augšdaļā atrodas siltuma elements, no kura nāk siltums (ko regulē uz augsnes parauga virskārtas novietots termorezistors). Temperatūru ievākšanas trauku aptverošajā dzesētajā ūdenī regulē uz ievākšanas trauka virsmas novietots termorezistors (novietots zemaugsnes pamata). Termorezistorus savieno ar ieprogrammējamu kontroles vienību, kas paaugstina temperatūru saskaņā ar ieprogrammētu grafiku. Dzīvnieki tiek savākti atdzesētajā ievākšanas traukā (2 °C), kura apakšu klāj ģipša/ogles slānis. Ekstrakcija kopā ilgst 48 stundas, tā sākas 25 °C temperatūrā, un temperatūru katru 12. stundu automātiski paaugstina par 5 °C. Ekstrakcija ir pabeigta pēc 12 stundām 40 °C temperatūrā.

1.b. Otrā metode: pēc eksperimentāla inkubācijas perioda kolembolu juvenīlo īpatņu skaitu nosaka ar flotāciju. Šim nolūkam testu veic traukos ar apmēram 250 ml tilpumu. Pēc testa beigām tajos tiek pievienoti apmēram 200 ml destilēta ūdens. Augsni maigi samaisa ar smalku otiņu, lai veicinātu kolembolu uzpeldēšanu ūdens virspusē. Ūdenim var pievienot nelielu daudzumu, apm. 0,5 ml, *Kentmere* fotogrāfiju krāsvielas, palielinot kontrastu starp ūdeni un baltajām kolembolām. Šī krāsviela nav toksiska kolembolām.

2. **Skaitīšana**

Skaitīšanu var veikt pēc redzes vai gaismas mikroskopā, izmantojot režģi, kas novietots virs flotācijas trauka, vai arī nofotografējot katra trauka virsmu un vēlāk saskaitot kolembolas palielinātās izdrukās vai projicētos attēlos. Skaitīšanu var veikt, arī izmantojot digitālās attēlu apstrādes ierīces (12). Visām skaitīšanas metodēm jābūt validētām.

▼M6

5. papildinājums

Augsnes maksimālās ūdensnoturspējas noteikšana

Turpmāk aprakstītā metode ir atzīta par piemērotu augsnes maksimālās ūdensnoturētspējas *(WHC)* noteikšanai. Tā ir aprakstīta ISO *DIS* 11268-2 C pielikumā (Augsnes kvalitāte – piesārņotāju ietekme uz sliekām (*Eisenia fetida*). 2. daļa: ietekmes uz vairošanos noteikšana).

Ievāciet noteiktu daudzumu (piem., 5 g) testējamās augsnes substrāta ar piemērotu parauga paņemšanas ierīci (skrūves cauruli u. c.) Nosedziet caurules apakšu ar mitra filtrpapīra gabalu un tad novietojiet uz statīva ūdens vannā. Caurule pakāpeniski jāiegremdē, līdz ūdens līmenis pārsniedz augsnes virsmu. Tad tā jāatstāj ūdenī apmēram uz trīs stundām. Tā kā nav iespējams saglabāt visu ūdeni, kas uzsūcies augsnes kapilāros, augsnes paraugam divas stundas jāļauj pažūt, novietojot cauruli uz ļoti smalki samaltu kvarca smilšu dobītes nosegtā traukā (lai novērstu izžūšanu). Tad paraugs jānosver, jāizžāvē līdz konstantai masai 105 °C temperatūrā. Ūdensnoturspēju *(WHC)* aprēķina šādi:

$$WHC\ (\%\ \text{sausās masas}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

kur

S = ar ūdeni piesātināts substrāts + caurules svars + filtrpapīra svars

T = tara (caurules svars + filtrpapīra svars)

D = substrāta saussvars

▼**M6**

6. papildinājums

Augsnes pH noteikšana

Turpmākā metode augsnes pH noteikšanai balstās uz aprakstu ISO *DIS* 10390: "Augsnes kvalitāte – pH noteikšana".

Noteiktu daudzumu augsnes žāvē istabas temperatūrā vismaz 12 h. Tad pagatavo augsnes suspensiju (kura satur vismaz 5 g augsnes) piecreiz lielākā tilpumā no 1 M analītiskās tīrības pakāpes kālija hlorīda (KCl) vai 0,01 M analītiskās tīrības pakāpes kalcija hlorīda ($CaCl_2$) šķīduma. Tad suspensiju kārtīgi sakrata piecas minūtes un ļauj nostādināties vismaz divas stundas, bet ne ilgāk kā 24 stundas. Tad izmēra šķidrās fāzes pH ar pH mērītāju, kas pirms katra mērījuma ticis kalibrēts, izmantojot atbilstošas buferšķīdumu sērijas (piem., pH 4,0 un 7,0).

▼M6

C.40. **TRĪSUĻODU DZĪVES CIKLA SEDIMENTU-ŪDENS TOKSICITĀTES TESTS, IZMANTOJOT AR TESTĒJAMO VIELU PAPILDINĀTU ŪDENI VAI PAPILDINĀTUS SEDIMENTUS**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 233 (2010. gads). Tā ir izstrādāta ietekmes novērtēšanai, kuru izraisa saldūdens divspārņu *Chironomus* sp. eksponētība ķīmiskām vielām visā to dzīves ciklā; tests pilnībā nosedz *Chironomus* sp. pirmo paaudzi (P paaudzi) un agrīno otro paaudzi (F1 paaudze). Tā papildina esošās testēšanas metodes C.28 (1) un C.27 (15), kurās izmanto attiecīgi papildināta ūdens ekspozīcijas scenāriju vai papildinātu sedimentu scenāriju. Metode ņem vērā jau esošos *Chironomus riparius* un *Chironomus dilutus* (agrākais nosaukums *C. tentans* (2)) toksicitātes testēšanas protokolus, kas ir izstrādāti Eiropā un Ziemeļamerikā (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) un kam pēc tam veikta starplaboratoriju salīdzinošā testēšana (1)(7)(10)(11)(12). Var izmantot arī citas labi izpētītas trīsuļodu sugas, piem., *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Kopējais ekspozīcijas ilgums ir apmēram 44 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui*, un aptuveni 100 dienas *C. dilutus*.

2. Šajā testēšanas metodē aprakstīti gan ūdens, gan sedimentu ekspozīcijas scenāriji. Atbilstīga ekspozīcijas scenārija izvēle ir atkarīga no paredzētā testēšanas pielietojuma. Ūdens ekspozīcijas scenārijs, kurā ūdens vertikālais slānis tiek papildināts ar testējamo ķīmisko vielu, ir izveidots, lai atdarinātu izsmidzinātu pesticīdu nonesi, un simulē to sākotnējo maksimuma koncentrāciju virszemes ūdeņos. Ūdens papildināšana ar testējamo ķīmisko vielu ir izmantojama arī citiem ekspozīcijas veidiem (ieskaitot ķīmisko vielu noplūdes), bet nav izmantojama, lai analizētu akumulācijas procesus sedimentos par testēšanas periodu ilgākā laikā. Šajā gadījumā, kā arī ja virszemes notece ir galvenais pesticīdu nokļūšanas ceļš ūdenskrātuvēs, piemērotāka būtu papildinātu sedimentu shēmas izmantošana. Ja nepieciešams pielietot citus ekspozīcijas scenārijus, testēšanas plānu var tiem viegli piemērot. Piemēram, ja nav nepieciešams noskaidrot testējamās ķīmiskās vielas sadalījumu starp ūdens fāzi un sedimentu slāni, un ir nepieciešams minimizēt adsorbciju sedimentos, ieteicams apsvērt aizvietojošu mākslīgu sedimentu (piem., kvarca smilšu) lietošanu.

3. Ķīmiskās vielas, kuru dēļ jātestē sedimentos dzīvojošie organismi, var saglabāties sedimentos ilgstoši. Sedimentos dzīvojošie organismi var tikt eksponēti dažādos veidos. Katra ekspozīcijas ceļa relatīvā nozīme un laiks, kas paiet, lai rastos vispārēja toksiska iedarbība, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja vai kas izveido homopolāru saiti ar sedimentiem, būtisks ekspozīcijas ceļš var būt piesārņotas barības uzņemšana. Lai nenovērtētu par zemu augsti lipofīlu ķīmisko vielu toksiskumu, var apsvērt pārtikas pievienošanu sedimentiem pirms testējamās ķīmiskās vielas izmantošanas (sk. 31. punktu). Tādējādi iespējams iekļaut visus ekspozīcijas ceļus un visas attīstības stadijas.

4. Mērītie beigupunkti ir izšķīlušos pieaugušo īpatņu (gan pirmajā, gan otrajā paaudzē) kopējais skaits, attīstības ātrums (gan pirmajā, gan otrajā paaudzē), pilnīgi izšķīlušos un dzīvo pieaugušo īpatņu dzimumu attiecība (gan pirmajā, gan otrajā paaudzē), oliņu virteņu skaits uz vienu mātīti (tikai pirmajā paaudzē), oliņu virteņu auglība (tikai pirmajā paaudzē).

5. Ļoti ieteicams izmantot formulēta sastāva sedimentus. Formulētā sastāva sedimentiem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar dabiskajiem sedimentiem:

▼M6

— tiek samazināta eksperimentālā mainība, jo šādi sedimenti izveido atkārtojamu "standartizētu matricu" un nav nepieciešams atrast nepiesārņotus un tīrus sedimentus;

— testēšanu var sākt jebkurā laikā, nesaskaroties ar sezonālu mainību testēšanas sedimentos, un nav nepieciešams sedimentus iepriekš apstrādāt, lai tos attīrītu no vietējās faunas;

— mazākas izmaksas salīdzinājumā ar sedimentu savākšanu dabā regulārai testēšanai pietiekamos daudzumos;

— formulēta sastāva sedimentu izmantošana ļauj salīdzināt dažādus toksicitātes pētījumus un attiecīgi klasificēt vielas (3).

6. Izmantotās definīcijas ir dotas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

7. Pirmās attīstības stadijas trīsuļodu kāpurus eksponē diapazonam testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju sedimentu un ūdens sistēmās. Tests sākas ar pirmās attīstības stadijas kāpuru (pirmā paaudze) ievietošanu testēšanas vārglāzēs, kuros ir formulētā sastāva sedimenti; citā variantā ūdeni papildina ar testējamo ķīmisko vielu pēc kāpuru ievietošanas. Nosaka trīsuļodu izšķilšanos, laiku līdz izšķilšanās brīdim un pilnīgi izšķīlušos un dzīvu odu dzimumu attiecību (attiecība starp tēviņu un mātīšu skaitu). Lai veicinātu izlidošanu, pārošanos un oliņu dēšanu, izšķīlušos pieaugušos īpatņus pārvieto uz vairošanās būriem. Novērtē saražoto oliņu virteņu skaitu un auglību. No šīm oliņu virtenēm tiek iegūti otrās paaudzes pirmās attīstības stadijas kāpuri. Šie kāpuri tiek ievietoti svaigi sagatavotās testēšanas vārglāzēs (procedūra papildināšanai ar testējamo vielu ir tāda pati kā pirmajai paaudzei) otrās paaudzes dzīvotspējas noteikšanai pēc izšķilšanās, laika līdz izšķilšanās brīdim un pilnīgi izšķīlušos un dzīvu odu attiecības starp dzimumiem (dzīves cikla tests shematiski parādīts 5. papildinājumā). Visus datus analizē, izmantojot regresijas modeli, lai noteiktu koncentrāciju, kas izraisītu pētītā beigupunkta X % samazinājumu, vai lietojot hipotēzes testu, lai noteiktu nenovērojamās ietekmes koncentrāciju *(NOEC)*. Otrajā gadījumā nepieciešams ar statistikas testu palīdzību salīdzināt apstrādes rezultātus (atbildes) ar atbilstošās kontrolgrupas rezultātiem. Jānorāda, ka papildinātā ūdens scenārija gadījumā, ja izmanto ķīmiskās vielas, kas ātri sadalās, katras paaudzes pēdējās attīstības stadijas (piem., kūniņas fāze) ir eksponētas ievērojami mazākai koncentrācijai virsējā ūdenī nekā pirmās attīstības stadijas kāpuri. Ja tas rada bažas un ir nepieciešami salīdzināmi ekspozīcijas līmeņi katrai attīstības stadijai, var apsvērt šādus metodes labojumus:

— paralēli testi ar testējamās vielas papildināšanu dažādās attīstības stadijās; vai

— atkārtota papildināšana ar testējamo ķīmisko vielu (vai virsējā ūdens nomaiņa) testēšanas sistēmā abu testa fāžu laikā (pirmā un otrā paaudze), līdz ar ko papildināšanas (ūdens nomaiņas) intervāli ir saskaņoti ar testējamās vielas aprites augsnē īpašībām.

Šādi metodes uzlabojumi ir iespējami papildinātā ūdens gadījumā, bet ne papildināto sedimentu gadījumā.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

8. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai ūdenī, tās tvaika spiedienam, log K_{ow}, izmērītajai vai aprēķinātajai sadalīšanās sedimentos daļai un stabilitātei ūdenī un sedimentos. Jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar ko iespējams kvantificēt testējamo ķīmisko vielu virsējā ūdenī,

▼M6

poru ūdenī un sedimentos ar zināmu un apstiprinātu precizitāti un detektēšanas robežu. Lietderīga informācija ietver testējamās ķīmiskās vielas struktūrformulu un tīrību. Tāpat lietderīgi ir zināt testējamās vielas ķīmisko apriti (piem., izkliedēšanās, abiotiskā un biotiskā noārdīšanās utt.). Papildu norādījumi par tādu vielu testēšanu, kuras ir sarežģīti testēt to fizikālo un ķīmisko īpašību dēļ, pieejami atsaucē (16).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

9. Periodiski var testēt ķīmiskās standartvielas, lai pārliecinātos, ka laboratorijas populācijas jutība nav mainījusies. Līdzīgi kā ar dafnijām, būtu pietiekami veikt akūto 48 stundu testu (kā aprakstīts 17). Taču kamēr nav pieejamas apstiprinātas akūtās vadlīnijas, ieteicams ilglaicīgais tests saskaņā ar šā pielikuma C.28 punktu. Toksisko standartvielu, kas sekmīgi izmantotas salīdzinošajos testos un validēšanas pētījumos, piemēri ietver lindānu, trifluralīnu, pentahlorfenolu, kadmija hlorīdu un kālija hlorīdu (1)(3)(6)(7)(18).

TESTA DERĪGUMS

10. Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— vidējam izšķilšanās rezultātam kontrolgrupas apstrādē jābūt vismaz 70 % abu paaudžu ekspozīcijas laika beigās (1) (7);

— kontrolgrupas apstrādē abām paaudzēm 85 % no visiem *C. riparius* un *C. yoshimatsui* jāpārveidojas par pieaugušiem īpatņiem 12–23 dienu laikā pēc pirmās stadijas kāpuru ievietošanas testēšanas traukos; *C. dilutus* pieļaujams 20–65 dienu ilgs periods;

— pilnībā izšķīlušos dzīvu pieaugušo īpatņu vidējai attiecībai starp dzimumiem (tēviņu/mātīšu skaita attiecība) abām paaudzēm kontrolgrupā jābūt vismaz 0,4, bet tā nedrīkst pārsniegt 0,6;

— pirmās paaudzes kontrolgrupā katrā vairošanās būrī oliņu virteņu skaitam jābūt vismaz 0,6 uz katru vairošanās būrī ievietoto mātīti;

— pirmās paaudzes kontrolgrupā katrā vairošanās būrī auglīgo oliņu virteņu daļai jābūt vismaz 0,6;

— ekspozīcijas laika beigās abām paaudzēm katrā traukā jānosaka pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija. Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (*ASV* [1]), savukārt pH virsējā ūdenī jābūt 6–9 diapazonā visos testēšanas traukos;

— ūdens temperatūra nedrīkstētu atšķirties vairāk kā par ± 1,0 °C.

METODES APRAKSTS

Testēšanas trauki un vairošanās būri

11. Kāpuru ekspozīcija notiek 600 ml stikla vārglāzēs ar apmēram 8,5 cm diametru (sk. 5. papildinājumu). Der arī citi trauki, bet tiem jānodrošina piemērots virsējā ūdens un sedimentu dziļums. Sedimentu virsmai jābūt pietiekamai, lai nodrošinātu 2–3 cm^2 katram kāpuram. Sedimentu slāņa dziļuma attiecībai pret virsējā ūdens dziļumu jābūt apmēram 1:4. Vēlams izmantot vairošanās būrus (vismaz 30 cm visās trijās dimensijās) ar sietu (atvērumi apmēram 1 mm) virspusē un vismaz vienā būra sānā (sk. 5. papildinājumu). Oliņu dēšanai katrā būrī ir ievietots 2 litru kristalizācijas trauks, kurā ir testēšanas ūdens un sedimenti. Arī kristalizācijas traukā

[1] Standarta atmosfēras spiedienā 20 °C gaisa piesātinājums saldūdeņos ir 9,1 mg/l (60 % vienāds ar 5,46 mg/l).

▼M6

dziļuma attiecībai pret virsējā ūdens dziļumu jābūt apmēram 1:4 Pēc tam, kad oliņu virtenes ir savāktas no kristalizācijas trauka, tās tiek ievietotas 12-iedobumu mikrotitrēšanas platē (viena oliņu virtene uz iedobumu, iedobumā vismaz 2,5 ml ūdens no papildinātā kristalizācijas trauka) un pārklātas ar vāku, lai izvairītos no būtiskas iztvaikošanas. Var izmantot arī citus oliņu virteņu ievietošanai piemērotus traukus. Izņemot mikrotitrēšanas plates, testēšanas traukiem un citām iekārtām, kas saskarsies ar testēšanas sistēmu, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla (piem., politetrafluoretilēna).

Sugu izvēle

12. Testēšanā vēlams izmantot *Chironomus riparius* sugas. Var izmantot arī *C. yoshimatsui.* Arī *C. dilutus* ir piemēroti, bet grūtāk apstrādājami, un tiem vajadzīgs ilgāks testēšanas periods. Sīkāka informācija par kultivēšanas metodēm attiecībā uz *Chironomus riparius* ir sniegta 2. papildinājumā. Informācija par kultivēšanas apstākļiem ir pieejama arī attiecībā uz *C. dilutus* (5) un *C. yoshimatsui* (14). Sugas identifikācija jāapstiprina pirms testēšanas, bet tā nav nepieciešama katram testam, ja organismi ir audzēti turpat uz vietas.

Sedimenti

13. Vēlams izmantot formulēta sastāva sedimentus (saukti arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem sedimentiem). Tomēr, ja izmanto dabiskos sedimentus, tie ir jāraksturo (vismaz pH, organiskā oglekļa sastāvs, ieteicama arī tādu citu parametru noteikšana kā C/N attiecība un granulometrija) un tajos nedrīkstētu būt nekāds piesārņojums un citi organismi, kas varētu konkurēt ar trīsuļodu kāpuriem vai baroties ar tiem. Ieteicams arī pirms izmantošanas sedimentus kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi pastāvēs testēšanā. Šajā testā (1), ir ieteicams izmantot šādus formulētā sastāva sedimentus (1)(20)(21):

a. 4-5 % (saussvars) kūdras: pēc iespējas pietuvināta pH 5,5–6,0; ir svarīgi izmantot pulverizētu kūdru, kas smalki samalta (daļiņu izmērs ≤ 1 mm) un kas ir izžāvēta vienīgi ar gaisu;

b. 20 % (saussvars) kaolīna mālu (kaolinīta saturam vēlams būt virs 30 %);

c. 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (pārsvarā tām jāsastāv no smalkām smiltīm, proti, vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm izmērā);

d. pievieno dejonizētu ūdeni, lai iegūtu galīgā maisījuma mitrumu 30–50 % diapazonā;

e. pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu ($CaCO_3$), lai koriģētu galīgā sedimentu maisījuma pH 7,0 ± 0,5 apmērā;

f. galīgā maisījuma organiskā oglekļa saturam jābūt 2 % (± 0,5), un tas jākoriģē, izmantojot atbilstīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu.

14. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu un smilšu avotam. Sedimentu sastāvdaļas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tajās nav ķīmiska piesārņojuma (piem., smago metālu, hlororganisko savienojumu, fosfororganisko savienojumu). Formulēta sastāva sedimentu sagatavošanas piemērs ir aprakstīts

▼M6

3. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja tiek pierādīts, ka pēc virsējā ūdens pievienošanas nenotiek sedimentu sastāvdaļu atdalīšanās (piem., kūdras daļiņu peldēšana pa ūdens virsmu) un ka kūdra vai sedimenti ir pietiekami kondicionēti.

Ūdens

15. Jebkurš ūdens, kas atbilst 2. un 4. papildinājumā noteiktajiem pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots kā testēšanas ūdens. Jebkāds piemērots ūdens, proti, dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens (sk. 2. papildinājumu) vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams kā kultivēšanas un testēšanas ūdens, ja trīsuļodi tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas un testēšanas laikā. Testēšanas sākumā testēšanas ūdens pH jābūt 6–9 diapazonā, savukārt kopējā cietība nedrīkst pārsniegt 400 mg/l kā $CaCO_3$. Tomēr, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4). Visa pētījuma laikā jāizmanto viena veida ūdens. Ūdens kvalitātes raksturlielumi, kas uzskaitīti 4. papildinājumā, jānosaka vismaz divreiz gadā vai tad, kad ir aizdomas, ka šie raksturlielumi varētu būt būtiski izmainījušies.

Izejšķīdumi – ar testējamo vielu papildināts ūdens

16.a. Testa koncentrācijas aprēķina, pamatojoties uz koncentrācijām ūdens vertikālajā slānī, t. i., ūdens virsējā slānī virs sedimentiem. Izraudzīto koncentrāciju testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumus vēlams pagatavot, izšķīdinot testējamo vielu testēšanas ūdenī. Lai iegūtu piemērotas koncentrācijas izejšķīdumu, dažos gadījumos var nākties izmantot šķīdinātājus vai dispersantus. Piemērotu šķīdinātāju piemēri ir acetons, etilspirts, metilspirts, etilēnglikola monoetilēteris, etilēnglikola dimetilēteris, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Dispersanti, ko var izmantot, ir *Cremophor RH40*, *Tween 80*, metilceluloze 0,01 % un HCO-40. Šķīdinātājas vielas koncentrācijai galīgajā testēšanas barotnē jābūt minimālai (t. i., ≤ 0,1 ml/l) un vienādai visās apstrādēs. Ja tiek izmantota šķīdinātāja viela, tai nedrīkst būt ievērojama ietekme uz izdzīvošanu un tā jāapstiprina ar šķīdinātāja kontrolgrupu salīdzinājumā ar negatīvo (ūdens) kontrolgrupu. Jebkurā gadījumā ir jācenšas izvairīties no šādu materiālu izmantošanas.

Izejšķīdumi – ar testējamo vielu papildināti sedimenti

16.b. Izraudzītās koncentrācijas papildinātos sedimentus parasti sagatavo, testējamās vielas šķīdumu tieši pievienojot sedimentiem. Dejonizētā ūdenī izšķīdinātas testējamās vielas izejšķīdumu samaisa ar formulēta sastāva sedimentiem, izmantojot velmēšanas dzirnavas, barības jaucēju vai manuālu jaukšanu. Ja testējamā viela ir ūdenī mazšķīstoša, to var izšķīdināt pēc iespējas mazākā tilpumā piemērota organiska šķīdinātāja (piem., heksāna, acetona vai hloroforma). Pēc tam šo šķīdumu samaisa ar 10 g smalku kvarca smilšu katram testēšanas traukam. Šķīdinātājam ļauj iztvaikot, un tam ir pilnībā jāpazūd no smiltīm. Pēc tam smiltis samaisa

▼M6

ar piemērotu daudzumu sedimentu. Testējamās vielas šķīdināšanai, dispersēšanai vai emulģēšanai drīkst izmantot tikai tādus preparātus, kas viegli izgaist. Jāpatur prātā, ka testējamās vielas nodrošinātās smiltis un smilšu maisījums ir jāņem vērā, sagatavojot sedimentus (proti, sedimenti ir jāsagatavo, izmantojot mazāk smilšu). Jānodrošina, ka sedimentiem pievienotā testējamā viela ir pienācīgi un vienmērīgi izkliedēta sedimentos. Ja vajadzīgs, var analizēt paraugus, lai noteiktu homogenitātes pakāpi.

TESTĒŠANAS PLĀNS

17. Testēšanas plāns attiecas uz testa koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, trauku skaitu katram koncentrācijas līmenim un kāpuru skaitu traukā, kristalizācijas trauku un vairošanās būru skaitu. Zemāk ir aprakstīti *ECx*, *NOEC* testu un pieļaujamā daudzuma testa plāni.

Regresijas analīzes plāns

18. Testēšanā izmantotajām koncentrācijām ir jāaptver ietekmes koncentrācija (*ECx*) un koncentrāciju diapazons tā, lai beigupunkts nebūtu jāekstrapolē ārpus ievāktajiem datiem. Jāizvairās no ekstrapolācijas krietni zem zemākās koncentrācijas vai virs augstākās koncentrācijas. Provizorisks diapazona noteikšanas tests, izmantojot testēšanas metodi C.27 vai C.28, palīdzēs izvēlēties piemērotu testa koncentrāciju diapazonu.

19. Saskaņā ar *ECx* pieeju, ir nepieciešamas vismaz piecas koncentrācijas un astoņi replikāti katrai koncentrācijai. Katrai koncentrācijai izmanto divus vairošanās būrus (A un B). Astoņus replikātus sadala divās grupās pa četriem replikātiem katrā, un katru grupu ievieto vienā vairošanās būrī. Šī replikātu apvienošana nepieciešama, lai būrī sasniegtu vairošanās novērtēšanai pietiekamu odu skaitu. Tomēr otrajā paaudzē atkal ir nepieciešami astoņi replikāti, kurus izveido no vairošanās būrī esošajām eksponētajām populācijām. Koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2 (izņēmums varētu būt gadījumi, kad devu un atbildes reakcijas līknei ir sekls slīpums). Katras apstrādes replikātu skaitu var samazināt līdz sešiem (trīs katrā turēšanas būrī), ja palielina testa koncentrāciju skaitu ar dažādām atbildes reakcijām. Replikātu skaita palielināšana vai testa koncentrāciju intervālu samazināšana parasti noved pie šaurākiem *ECx* testēšanas ticamības intervāliem.

***NOEC* noteikšanas plāns**

20. *NOEC* pieejai nepieciešamas piecas testa koncentrācijas ar vismaz astoņiem replikātiem (4 katrā būrī, A un B), un koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2. Replikātu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu statistisko nozīmību un varētu detektēt 20 % atšķirību no kontrolgrupas pie 5 % nozīmības līmeņa (α = 0,05). Attīstības ātruma, potenciālās auglības un auglības novērtēšanai ir piemērota dispersijas analīze *(ANOVA)*, tai seko Daneta tests vai Viljamsa tests (22–25). Izšķilšanās koeficientu un dzimumu attiecības novērtēšanai ir piemēroti Kohrana-Armitāža tests, Fišera eksaktais tests (ar Bonferoni korekciju) un Mantela-Hencala tests.

Pieļaujamā daudzuma tests

21. Pieļaujamā daudzuma testu (viena testa koncentrācija un kontroles trauks) var veikt, ja izvēles provizoriskajā diapazona noteikšanas testā netika konstatēta ietekme līdz maksimālajai koncentrācijai. Pieļaujamā daudzuma testa mērķis ir parādīt, ka testējamajai ķīmiskajai vielai ir toksiska iedarbība koncentrācijās, kas ir augstākas par pieļaujamā daudzuma testā analizētajām. Tās būtu 100 mg/l ūdenim un 1 000 mg/kg (saussvars) sedimentiem. Parasti nepieciešami vismaz astoņi replikāti gan apstrādes, gan kontrolgrupas variantiem. Ir jāpanāk pietiekama statistiskā nozīmība,

▼M6

lai varētu detektēt 20 % atšķirību no kontrolgrupas pie 5 % nozīmības līmeņa (α = 0,05). Ar metrisku atbildes reakciju (piem., attīstības ātrums) t-tests parasti ir piemērota statistiskā metode, ja dati atbilst šā testa prasībām (normalitāte, homogēnas dispersijas). Ja rezultāti neatbilst šīm prasībām, var izmantot nevienlīdzīgās dispersijas t-testu vai kādu no neparametriskajiem testiem, piem., Vilkoksona-Manna-Vitneja testu. Fišera eksaktais tests ir piemērots izšķilšanās koeficientu analīzei.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Sedimentu-ūdens sistēmas sagatavošana (ūdens papildināšana ar testējamo vielu)

22.a. Formulēta sastāva sedimentus (sk. 13.–14. punktu 3. papildinājumā) ievieto katrā testēšanas traukā un kristalizācijas traukā tā, lai slānis ir vismaz 1,5 cm dziļš (kristalizācijas traukā tas var būt mazliet mazāks) un ne dziļāks par 3 cm. Ūdeni (sk. 15. punktu) pievieno tik daudz, lai attiecība starp sedimentu un ūdens slāņa dziļumu nepārsniegtu 1:4. Pēc ievietošanas testēšanas traukos sedimentu-ūdens sistēma jāatstāj vieglas aerācijas apstākļos apmēram septiņas dienas, pēc kurām tiek pievienoti pirmās attīstības stadijas pirmās vai otrās paaudzes kāpuri (sk. 3. pielikuma 14. punktu). Testa laikā kristalizācijas trauku sedimentu-ūdens sistēma netiek aerēta, jo nav nepieciešamības papildus veicināt kāpuru izdzīvošanu (pirms oliņu virteņu savākšanas). Lai izvairītos no sedimentu sastāvdaļu atdalīšanās un smalku daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens vertikālajā slānī testēšanas ūdens pievienošanas laikā, sedimentus var pārklāt ar plastmasas ripu ūdens uzliešanas laikā. Pēc tam ripu nekavējoties noņem. Šim nolūkam der arī citas ierīces.

Sedimentu-ūdens sistēmas sagatavošana (testējamā viela pievienota sedimentos)

22.b. Ar testējamo ķīmisko vielu papildinātus sedimentus, kas pagatavoti saskaņā ar 16.b. punktu, ievieto testēšanas traukos un kristalizācijas traukos; virsējais ūdens tiek pievienots, panākot sedimentu-ūdens slāņu dziļumu attiecību 1:4. Sedimentu slāņa dziļumam jābūt diapazonā 1,5–3 cm (kristalizācijas traukos tas var būt nedaudz mazāks). Lai izvairītos no sedimentu sastāvdaļu atdalīšanās un smalku daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens vertikālajā slānī testēšanas ūdens pievienošanas laikā, sedimentus var pārklāt ar plastmasas ripu ūdens uzliešanas laikā, bet pēc tam ripu nekavējoties noņem. Šim nolūkam der arī citas ierīces. Tiklīdz ir sagatavoti papildinātie sedimenti ar virsējo ūdeni, ir vēlams ļaut testējamai vielai izdalīties no sedimentiem un sajaukties ar ūdens fāzi un (4)(5)(7)(18). To vēlams īstenot tādos pašos temperatūras un aerācijas apstākļos, kādus izmanto testēšanā. Atbilstīgais līdzsvara iestāšanās laiks ir atkarīgs no konkrētajiem sedimentiem un ķīmiskās vielas, tas var būt stundu vai dienu ilgs un retos gadījumos ilgt līdz pat piecām nedēļām. Tā kā šajā laikā varētu noārdīties daudzas ķīmiskās vielas, līdzsvara iestāšanās netiek gaidīta, bet līdzsvarošanai ieteicams paredzēt 48 stundas. Tomēr, ja ir zināms, ka sedimentos ievadītajai ķīmiskajai vielai ir garš pussadalīšanās periods (sk. 8. punktu), līdzsvarošanas laiku var pagarināt. Šā turpmākās līdzsvarošanas perioda beigās ir jānosaka testējamās vielas koncentrācija virsējā ūdenī, poru ūdenī un sedimentos, proti, vismaz augstākā un zemākā koncentrācija (sk. 38. punktu). Šie testējamās vielas analītiskie mērījumi ļauj aprēķināt masas bilanci un noteikt rezultātus, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām.

23. Testēšanas trauki ir jāapsedz (piem., ar stikla plāksnēm). Ja vajadzīgs, pētījuma laikā ūdens līmeņus papildina līdz sākotnējam tilpumam, lai kompensētu ūdens iztvaikošanu. Tam jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, lai novērstu sāļu uzkrāšanos. Kristalizācijas trauki vairošanās

▼M6

būros netiek apsegti; to ūdens līmeni var regulēt, lai kompensētu testēšanas laika ūdens zudumus, bet tas nav obligāti, jo oliņu virtenes ir kontaktā ar ūdeni tikai vienu dienu un trauki tiek lietoti tikai īsu laiku.

Testa organismu pievienošana

24. Četras līdz piecas dienas pirms pirmās paaudzes ražošanai paredzēto kāpuru pievienošanas no kultūras jāizņem oliņu masa un jāievieto nelielos traukos ar kultivēšanas barotni. Var izmantot izturētu barotni no pamatkultūras vai svaigi sagatavotu barotni. Jebkurā gadījumā kultivēšanas barotnei jāpievieno neliels daudzums barības, piem., zaļaļģes un/vai daži pilieni filtrāta no smalki samaltas zivju barības pārslu suspensijas (sk. 2. papildinājumu). Jāizmanto tikai svaigi izdētas oliņas. Parasti kāpuri sāk šķilties dažas dienas pēc oliņu izdēšanas (*C. riparius* pēc 2–3 dienām pie 20 °C, savukārt pēc 1–4 dienām *C. dilutus* pie 23 °C un *C. yoshimatsui* pie 25 °C), un kāpuru augšana notiek četrās attīstības stadijās, no kurām katra ilgst 4–8 dienas. Testēšanā jāizmanto pirmās attīstības stadijas kāpuri (vēlākais 48 h pēc izšķilšanās). Kāpuru attīstības stadiju var pārbaudīt, izmantojot galvas kapsulas platumu (7).

25. Divdesmit pirmās attīstības stadijas kāpurus no pirmās paaudzes ar neasu pipeti vienmērīgi izvieto katrā testēšanas traukā, kurā ir sedimentu-ūdens sistēma. Ūdens aerācija tiek apturēta uz kāpuru ievietošanas laiku un uz nākamajām 24 stundām, kurās turpinās kāpuru ievietošana (sk. 32. punktu). Saskaņā ar pielietoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu), uz katru koncentrāciju izmanto vismaz 120 kāpurus (6 replikāti uz koncentrāciju) *ECx* noteikšanai, un 160 kāpurus *NOEC* noteikšanai (8 replikāti uz koncentrāciju). Papildināto sedimentu sistēmā ekspozīcija sākas ar kāpuru ievietošanu.

Testējamās vielas pievienošana virsējam ūdenim

26. Kad ir pagājušas 24 stundas pēc pirmās paaudzes pirmās attīstības stadijas kāpuru pievienošanas, virsējo ūdeni piesātina ar testējamo ķīmisko vielu un atsāk lēnu aerāciju (testēšanas plāna iespējamās izmaiņas aprakstītas 7. punktā). Nelielus testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdumu tilpumus pievieno zem ūdens virsmas, izmantojot pipeti. Pēc tam virsējais ūdens ir uzmanīgi jāsamaisa, neizkustinot sedimentus. Papildinātā ūdens sistēmā ekspozīcija sākas ar testējamās vielas pievienošanu ūdenim (piem., vienu dienu pēc kāpuru pievienošanas).

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu savākšana

27. Pirmās paaudzes izšķīlušies odi tiek savākti vismaz vienu, bet labāk divas reizes dienā (sk. 36. punktu), izmantojot aspiratoru, iesūcēju vai līdzīgu ierīci (sk. 5. papildinājumu). Jācenšas netraumēt pieaugušos īpatņus. No vienas apstrādes četriem testēšanas traukiem savāktie odi tiek ielaisti tiem paredzētajā audzēšanas būrī. Pirmajā (tēviņu) izšķilšanās dienā kristalizācijas trauki tiek papildināti, ar pipeti zem ūdens līmeņa iepilinot nelielu daudzumu testējamās ķīmiskās vielas izejšķīduma (papildinātā ūdens

▼M6

sistēmā). Pēc tam ūdens virsējais slānis ir uzmanīgi jāsamaisa, neizkustinot sedimentus. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija kristalizācijas traukā nomināli ir tāda pati kā apstrādes traukos, kas paredzēti konkrētajam audzēšanas būrim. Papildināto sedimentu sistēmā kristalizācijas trauki tiek sagatavoti apmēram 11. dienā pēc ekspozīcijas sākuma (pēc pirmās paaudzes kāpuru pievienošanas), lai tie paspētu iziet izlīdzināšanās procesu 48 stundu laikā pirms pirmo oliņu virteņu rašanās.

28. Oliņu virtenes tiek savāktas no kristalizācijas traukiem, izmantojot pinceti vai neasu pipeti. Katru oliņu virteni ievieto traukā, kurā ir kultivēšanas barotne no tā kristalizācijas trauka, no kura tā tika ievākta (piem., iedobums 12 iedobumu plāksnē kopā ar vismaz 2,5 ml barotnes). Oliņu virteņu trauciņus nosedz ar vāku, lai novērstu būtisku iztvaikošanu. Oliņu virtenes tiek novērotas vismaz sešas dienas pēc to izveidošanas, lai tās varētu novērtēt kā auglīgas vai neauglīgas.

Otrās paaudzes sākumā no katra būra tiek ievāktas vismaz trīs, vēlams sešas oliņu virtenes, un kopā ar nelielu daudzumu barības tiek noliktas šķilties. Vēlams, lai šīs oliņu virtenes ir saražotas oliņu dēšanas maksimuma laikā, kas normāli notiek testa 19. dienā kontrolgrupas variantā. Vislabāk, ja otrās paaudzes visas apstrādes sāk vienā un tai pašā dienā, taču ķīmisko vielu izraisītās ietekmes uz kāpuru attīstību dēļ tas ne vienmēr ir iespējams. Šādā gadījumā augstāko koncentrāciju testēšana var tik uzsākta vēlāk nekā zemāko koncentrāciju, kontrolgrupas un šķīdinātāja kontrolgrupas testēšana.

29.a. Papildinātā ūdens shēmā sedimentu-ūdens sistēma otrajai paaudzei tiek sagatavota, pievienojot testējamo ķīmisko vielu virsējam ūdenim apmēram vienu stundu pirms pirmās attīstības stadijas kāpuru pievienošanas testēšanas traukos. Nelielus testējamās ķīmiskās vielas izejšķīdumu tilpumus pievieno zem ūdens virsmas, izmantojot pipeti. Pēc tam virsējo ūdeni ir uzmanīgi jāsamaisa, neizkustinot sedimentus. Pēc testējamās vielas pievadīšanas tiek veikta viegla aerācija.

29.b. Papildināto sedimentu shēmā ekspozīcijas trauki ar otrajai paaudzei izveidoto sedimentu-ūdens sistēmu tiek sagatavoti tādā pašā veidā kā pirmajai paaudzei.

30. Katrā testēšanas traukā ar papildinātiem sedimentiem un ūdeni pēc nejaušības principa ievieto 20 otrās paaudzes pirmās attīstības stadijas kāpurus (ne vairāk kā 48 stundas pēc izšķilšanās), izmantojot neasu pipeti. Pirmās attīstības stadijas kāpuru ievietošanas laikā testēšanas traukos ir jāpārtrauc ūdens aerācija, un šis pārtraukums jāturpina vēl 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas. Saskaņā ar pielietoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu), izmantoto kāpuru skaits uz katru koncentrāciju ir vismaz 120 (6 replikāti uz koncentrāciju) *ECx* noteikšanai, un 160 kāpuri *NOEC* noteikšanai (8 replikāti uz koncentrāciju).

Barība

31. Testēšanas traukos ievietotie kāpuri ir jābaro, vēlams, katru dienu vai vismaz trīs reizes nedēļā. Katram jaunam kāpuram pirmās 10 dienas pietiek ar zivju barību (suspensija ūdenī vai smalki samalta barība, piem., *TetraMin* vai *TetraPhyll*, sk. 2. papildinājumu) 0,25–0,5 mg apmērā (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui*). Nedaudz vairāk barības varētu vajadzēt vecākiem kāpuriem, proti, 0,5–1 mg uz kāpuru dienā, ar ko vajadzētu pietikt līdz testēšanas beigām. Ja tiek novērota sēnīšu augšana vai ja kontroles traukos ir novērota mirstība, barības porcija ir jāsamazina visos apstrādes traukos un kontroles traukos. Ja sēnīšu vairošanos neizdodas apturēt, tests ir jāatkārto.

Ekspozīcijas toksikoloģiskais būtiskums, uzņemot ķīmisko vielu ar barību, ir augstāks ķīmiskajām vielām ar augstu afinitāti pret organisko oglekli vai vielām, kas kovalenti saistās ar sedimentiem. Ja testē vielas ar šādām īpašībām, izdzīvošanas un normālas augšanas nodrošināšanai nepieciešamo barības daudzumu var pievienot formulēta sastāva sedimentiem pirms stabilizācijas atkarībā no regulēšanas vajadzībām. Lai novērstu ūdens kvalitātes pasliktināšanos, zivju barība jāaizstāj ar augu materiālu,

▼M6

piem., pievienojot 0,5 % (saussvara) smalki samaltu lielās nātres *(Urtica dioica)*, baltā zīdkoka *(Morus alba)*, baltā āboliņa *(Trifolium repens)*, spinātu *(Spinacia oleracea)* lapu vai arī citus augu preparātus (*Cerophyl* vai α-celuloze). Pilnas barības devas pievienošana sedimentiem pirms testējamās ķīmiskās vielas nav mazsvarīga attiecībā uz ūdens kvalitāti un bioloģisko izpildījumu (21), un šī metode nav standartizēta; tomēr jaunākie pētījumi liecina, ka šī metode darbojas (19) (26). Pieaugušajiem īpatņiem būros parasti nav nepieciešama barība, tomēr to potenciālo auglību un auglību var veicināt, ja pieaugušajiem kukaiņiem, kas tikko izšķīlušies, barībai piedāvā piesātinātas saharozes šķīdumā mērcētu vates piciņu (34).

Inkubācijas apstākļi

32. Abu paaudžu testēšanas traukos 24 stundas pēc pirmās attīstības stadijas kāpuru pievienošanas sāk lēnu virsējā ūdens aerāciju, kas tiek turpināta turpmākā testa laikā (jārūpējas, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nebūtu zem 60 % gaisa piesātinājuma vērtības). Aerācija tiek nodrošināta ar Pastēra pipeti no stikla, kuras gals fiksēts 2–3 cm virs sedimentu slāņa un kas dod dažus burbuļus sekundē. Ja tiek testētas gaistošas ķīmiskās vielas, jāapsver iespēja neaerēt sedimentu-ūdens sistēmu, taču tajā pašā laikā ir jānodrošina atbilstība testa derīguma kritērijam – 60 % gaisa piesātinājuma (10. punkts). Turpmāki norādījumi sniegti (16).

33. *C. riparius* testēšanu veic nemainīgā 20 °C (± 2 °C) temperatūrā. *C. dilutus* un *C. yoshimatsui* ieteicamā temperatūra ir attiecīgi 23 °C un 25 °C (± 2 °C). Piemēro 16 stundu fotoperioda ilgumu, un gaismas intensitātei jābūt robežās 500–1 000 luksi. Vairošanās būru režīmam var pievienot stundu garus rīta un vakara krēslas periodus.

Ekspozīcijas ilgums

34. Papildinātā ūdens shēma: pirmās paaudzes ekspozīcijas laiks sākas brīdī, kad testējamo ķīmisko vielu pievieno virsējam ūdenim testēšanas traukos (vienu dienu pēc kāpuru ievietošanas, ekspozīcijas shēmas iespējamus labojumus sk. 7. punktā). Otrās paaudzes kāpuru ekspozīcija tiek sākta uzreiz, jo tos ievieto sedimentu-ūdens sistēmā, kurai jau pievienota testējamā ķīmiskā viela. Maksimālais ekspozīcijas ilgums *C. riparius* un *C. yoshimatui* ir 27 dienas pirmajai paaudzei un 28 dienas otrajai paaudzei (pirmā paaudze vienu dienu pavada testēšanas traukos bez ekspozīcijas). Ņemot vērā pārklāšanos, kopējais testēšanas ilgums ir aptuveni 44 dienas. Maksimālais ekspozīcijas ilgums *C. dilutus* pirmajai un otrajai paaudzei ir attiecīgi 64 un 65 dienas. Kopējais ilgums ir aptuveni 100 dienas.

Papildināto sedimentu shēma: ekspozīcija sākas ar kāpuru pievienošanu, tā ilgst maksimums 28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* abām paaudzēm un maksimums 65 dienas *C. dilutus* abām paaudzēm.

Novērojumi

Izšķilšanās

35. Abām paaudzēm tiek noteikts attīstības ilgums un pilnīgi izšķīlušos un dzīvo odu tēviņu un mātīšu skaits. Tēviņus ir viegli identificēt pēc ķemmveidīgajiem taustekļiem un slaidā ķermeņa.

▼M6

36. Abu paaudžu testēšanas trauki ir jānovēro vismaz trīs reizes nedēļā, lai vizuāli novērtētu jebkādas anomālijas (piem., sedimentu pamešana, neparasta peldēšana) salīdzinājumā ar kontroles traukiem. Paredzamās izšķilšanās periodā, kas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* sākas 12 dienas pēc kāpuru ievietošanas (*C. dilutus* – 20 dienas), izšķīlušies odi katru dienu, vēlams divas reizes dienā (agri no rīta un vēlā pēcpusdienā) jāskaita un jānosaka to dzimums. Pēc identificēšanas pirmās paaudzes odi tiek uzmanīgi pārvietoti no traukiem uz būriem. Otrās paaudzes odi pēc identificēšanas tiek aizvākti un likvidēti. Visas testēšanas traukos atrodamās pirmās paaudzes ražotās olu virtenes ir atsevišķi jāsavāc un kopā ar vismaz 2,5 ml agrākās vides ūdens jāpārliek 12-iedobumu platēs (vai citos piemērotos traukos), kas tiek pārklāti ar vāku, lai novērstu būtisku iztvaikošanu. Jāreģistrē arī mirušo kāpuru un redzamo kūniņu skaits, kuras nav izšķīlušās. Vairošanās būru, testēšanas trauku un iesūcēju piemēri parādīti 5. papildinājumā.

Vairošanās

37. Par ietekmi uz vairošanos liecina pirmās paaudzes odu saražoto oliņu virteņu skaits un šo oliņu virteņu auglība. Katru dienu no audzēšanas konteinerā ievietotā kristalizācijas trauka tiek savāktas oliņu virtenes. Oliņu virtenes ir jāsavāc un jāpārliek 12-iedobumu plākšņu iedobumos ar vismaz 2,5 ml agrākās vides ūdens (katrā iedobumā viena oliņu virtene), vai citos piemērotos traukos, kas tiek pārklāti ar vāku, lai novērstu būtisku iztvaikošanu. Katrai oliņu virtenei ir jānovērtē šādi parametri: izdēšanas diena; izmērs (normāla, t.i., 1,0 ± 0,3 cm vai maza, parasti ≤ 0,5 cm); struktūra (normāla – banāna forma, ar spirālveida oliņu virknēm vai anomāla, piem., oliņu virknes nav sakārtotas spirālē) un auglība (auglīgas vai neauglīgas). Oliņu virtenes auglība tiek novērtēta sešu dienu laikā pēc tās izdēšanas. Oliņu virtene tiek uzskatīta par auglīgu, ja izšķiļas vismaz viena trešdaļa oliņu. Lai aprēķinātu oliņu virteņu skaitu uz mātīti un auglīgu oliņu virteņu skaitu uz mātīti, izmanto kopējo būrī ielaisto mātīšu skaitu. Ja nepieciešams, oliņu skaitu virtenē var nedestruktīvi noteikt, izmantojot apļu skaitīšanas metodi (detalizēta informācija atsaucē (32) un (33)).

Analītiskie mērījumi

Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija

38. Jāanalizē vismaz virsējā ūdens, poru ūdens un sedimentu paraugi; tas darāms ekspozīcijas sākumā (ja testējamā viela pievienota ūdenim, tad vēlams vienu stundu pēc pievienošanas) un testa beigās – augstākajā un zemākajā koncentrācijā. Tas attiecas uz abu paaudžu testēšanas traukiem. Būros novietotajos kristalizācijas traukos tiek analizēts tikai virsējais ūdens, jo oliņu virtenes ir kontaktā tikai ar to (papildināto sedimentu shēmā jāapsver arī sedimentu koncentrāciju analītiskā apstiprināšana). Ja uzskata par nepieciešamu, testa laikā var veikt sedimentu, poru ūdens un virsējā ūdens papildu mērījumus. Šie testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju mērījumi ļauj spriest par testējamās vielas uzvedību/izkliedēšanos sedimentu-ūdens sistēmā. Lai varētu ievākt sedimentus un poru ūdeni

▼M6

testa sākumā un laikā (sk. 39. punktu), ir nepieciešami papildu testēšanas trauki analīžu veikšanai. Mērījumi papildinātā ūdens shēmā var nebūt nepieciešami, ja testējamās ķīmiskās vielas izkliedēšanās starp ūdeni un sedimentiem ir skaidri zināma citos sedimentu/ūdens pētījumos, kas veikti salīdzināmos apstākļos (piem., sedimentu/ūdens attiecība, ķīmiskās vielas pievienošanas veids, organiskā oglekļa daudzums sedimentos), vai arī ja ir parādīts, ka virsējā ūdenī izmērītās koncentrācijas saglabājas 80–120 % robežās no nominālajām vai sākotnējām izmērītajām koncentrācijām.

39. Ja veic starpposma mērījumus (piem., 7. un/vai 14. dienā) un ja analīzei ir vajadzīgi lieli paraugi, ko nevar paņemt no testēšanas traukiem, neietekmējot testēšanas sistēmu, jāveic analītiska noteikšana no paraugiem, kuri ņemti no papildu testēšanas traukiem, kas saņēmuši tādu pašu apstrādi (ietverot testa organismu klātbūtni), bet netiek izmantoti bioloģiskajiem novērojumiem.

40. Lai izolētu starpūdeni (poru ūdeni), ieteicama centrifugēšana, piem., 10 000 g 4 °C temperatūrā 30 minūtes. Tomēr, ja tiek pierādīts, ka testējamā viela neadsorbējas uz filtriem, var būt pieņemami izmantot arī filtrēšanu. Dažos gadījumos var būt neiespējami analizēt koncentrācijas poru ūdenī, jo parauga izmērs ir pārāk mazs.

Fizikālie un ķīmiskie parametri

41. Ievērojot atbilstošos nosacījumus (sk. 10. punktu), izmēra pH un izšķīdušo skābekli testēšanas ūdenī, kā arī ūdens temperatūru testēšanas un kristalizācijas traukos. Testēšanas sākumā un beigās jānosaka arī cietība un amonjaks kontroles traukos un vienā testēšanas un kristalizācijas traukā ar augstāko koncentrāciju.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Šā dzīves cikla testa mērķis ir novērtēt testējamās ķīmiskās vielas ietekmi uz vairošanos (divām paaudzēm), attīstības ātrumu un pilnīgi izšķīlušos un dzīvo odu tēviņu un mātīšu skaitu. Lai aprēķinātu izšķilšanās koeficientu, tēviņi un mātītes jāapvieno. Ja nav statistiski būtisku atšķirību starp abiem dzimumiem attīstības ātrumā, statistiskajās analīzēs tēviņu un mātīšu rezultātus var apvienot.

43. Ietekmes koncentrācijas, kas izteiktas kā koncentrācijas virsējā ūdenī (ja testējamā viela pievienota ūdenim) vai sedimentos (ja testējamā viela pievienota sedimentiem) parasti aprēķina, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām ekspozīcijas sākumā (sk. 38. punktu). Tādēļ papildinātajam ūdenim katrai ekspozīcijai aprēķina vidējo koncentrāciju, ko parasti mēra ekspozīcijas sākumā virsējā ūdenī abu paaudžu traukos un kristalizācijas traukos. Papildinātajiem sedimentiem katrai apstrādei aprēķina vidējo no koncentrācijām, ko parasti mēra ekspozīcijas sākumā abu paaudžu traukos (un pēc izvēles arī kristalizācijas traukos).

44. Punktu, piem., *ECx*, aplēsei īsto replikātu vietā var izmantot statistiku uz katru trauku un katru būri. Aprēķinot ticamības intervālu jebkurai *ECx*, jāņem vērā mainība starp traukiem vai ir jāpierāda, ka šī mainība ir tik maza, ka to var neņemt vērā. Ja modelim izmanto lineāro regresiju, statistika uz katru trauku ir jākoriģē, lai uzlabotu dispersijas homogenitāti. Tomēr *ECx* vērtības ir jāaprēķina pēc tam, kad atbildes reakcija ir transformēta atpakaļ uz sākotnējo vērtību (31).

▼M6

45. Ja statistiskās analīzes mērķis ir noteikt *NOEC* ar hipotēzes testu, jāņem vērā mainība starp traukiem, ko garantē *ANOVA* metožu (piem., Viljamsa un Daneta testu) izmantošana. Viljamsa tests ir piemērots gadījumiem, kad teorētiski ir sagaidāma monotona reakcija uz devu; Daneta tests piemērots gadījumā, ja monotonitātes hipotēze netiek uzturēta. Situācijās, kad nedarbojas parastie *ANOVA* pieņēmumi (31), var izmantot stabilākus testus (27).

Izšķilšanās koeficients

46. Izšķilšanās koeficienti ir kvantu dati, ko var analizēt ar descendentu Kohrana-Armitāža testu, ja ir paredzama monotona reakcija uz devu un ja šie dati atbilst šādai prognozei. Ja minētais tests analīzei neder, var izmantot Fišera eksakto testu vai Mantela-Hencala testu ar Bonferoni-Holma koriģētajām p-vērtībām. Ja pastāv liecības par lielāku mainību starp replikātiem ar vienu un to pašu koncentrāciju nekā to norādītu binomināls sadalījums (nereti uz to atsaucas kā uz "papildu binominālu" mainību), tad jāizmanto stabils Kohrana-Armitāža tests vai Fišera eksaktais tests, kā ieteikts atsaucē (27).

Vienā traukā izšķīlušos dzīvo odu (mātītes plus tēviņi) summa n_e, tiek noteikta un izdalīta ar ievietoto kāpuru skaitu, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kur:

ER = izšķilšanās koeficients;

n_e = izšķīlušos dzīvo odu skaits traukā;

n_a = ievietoto kāpuru skaits traukā (parasti 20).

Ja n_e ir lielāks nekā n_a (t.i., nejauši traukos ir ielikts vairāk kāpuru nekā plānots), n_a jāpielīdzina n_e.

47. Liela apjoma paraugiem ar papildu binominālu dispersiju piemērota alternatīva ir izšķilšanās koeficientu uzskatīt par nepārtrauktu atbildes reakciju un izmantot procedūras, kas atbilst šiem izšķilšanās koeficienta datiem. Šajā kontekstā liels parauga apjoms tiek definēts kā gadījums, kad gan izšķīlušos īpatņu skaits, gan neizšķīlušos īpatņu skaits pārsniedz piecus uz katru replikātu (trauku).

48. Lai piemērotu *ANOVA* metodes, izšķilšanās koeficienta vērtības ir vispirms jāpārvērš ar arksinusa kvadrātsaknes vai Takeja-Frīmena transformāciju, lai iegūtu aptuveno normālo sadalījumu un izlīdzinātu dispersijas. Izmantojot absolūto periodiskumu, var piemērot Kohrāna-Armitāža testu, Fišera eksakto testu (Bonferoni) vai Mantela-Hencala testu. Arksinusa kvadrātsaknes transformāciju piemēro, ņemot izšķilšanās koeficienta kvadrātsaknes inverso sinusu ($sine^{-1}$).

49. Izšķilšanās koeficientiem *ECx* vērtības aprēķina, izmantojot regresijas analīzi (piem., *probit*, *logit* vai Veibula modeļus (28)). Ja regresijas analīze ir nesekmīga (piem., tiek iegūtas mazāk nekā divas daļējas atbildes reakcijas), izmanto citas ar parametriem nesaistītas metodes, tādas kā slīdošā vidējā vai vienkāršā interpolācija.

Attīstības ātrums

50. Vidējais attīstības laiks ir vidējais laikposms starp kāpuru ielaišanu (testa 0. diena) un testējamās kohortas odu izšķilšanos (lai aprēķinātu patieso attīstības laiku, jāapsver kāpuru vecums ielaišanas brīdī). Attīstības ātrums ir attīstības laika apgrieztā vērtība (vienība: 1/diena) un tas reprezentē kāpuru attīstības posmu, kas noris vienas dienas laikā. Šo sedimentu toksicitātes pētījumu novērtēšanai attīstības ātrums ir ieteicamāks, jo tā

▼**M6**

dispersija ir mazāka un tas ir homogēnāks un tuvāks normālajam sadalījumam salīdzinājumā ar attīstības laiku. Tādējādi efektīvas parametru testēšanas procedūras var izmantot drīzāk ar attīstības ātrumu, nevis ar attīstības laiku. Attiecībā uz attīstības ātrumu kā nepārtrauktu atbildes reakciju *ECx* vērtības var aplēst, izmantojot regresijas analīzi (piem., (29)(30)). Vidējā attīstības ātruma *NOEC* var noteikt ar *ANOVA* metodēm, piem., Viljamsa vai Daneta testu. Tā kā tēviņi izšķiļas agrāk nekā mātītes, tātad tiem ir augstāks attīstības ātrums, ir vērts aprēķināt attīstības ātrumu gan katram dzimumam atsevišķi, gan visiem odiem kopā.

51. Statistiskajiem testiem pieņem, ka pārbaudes dienā x novēroto odu skaits ir izšķīlies vidējā laika intervālā starp dienu x un dienu x–l (l = pārbaudes intervāla ilgums, parasti 1 diena). Katrā traukā vidējo attīstības ātrumu ($\bar{x}$) aprēķina šādi:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

kur:

$\bar{x}$: vidējais attīstības ātrums katrā traukā;

i: pārbaudes intervāla indekss;

m: pārbaudes intervālu maksimālais skaits;

f_i: pārbaudes intervālā i izšķīlušos odu skaits;

n_e: kopējais odu skaits, kas izšķīlušies eksperimenta beigās (Σf_i));

x_i: intervālā i izšķīlušos odu attīstības ātrums.

$$x_i = 1/\text{diena}_i - \frac{l_i}{2}$$

kur:

diena_i: pārbaudes diena (dienas kopš kāpuru ievietošanas);

l_i: pārbaudes intervāla i garums (dienas, parasti 1 diena).

Dzimumu attiecība

52. Attiecība starp dzimumiem ir kvantu dati, un tādēļ būtu vērtējami ar Fišera eksakto testu vai citām piemērotām metodēm. *C. riparius* dabiskā attiecība starp dzimumiem ir viens, jo tēviņi un mātītes ir sastopami vienlīdz bieži. Abām paaudzēm attiecības starp dzimumiem dati ir jāapstrādā vienādi. Tā kā maksimālais odu daudzums uz trauku (piem., 20) ir

▼M6

pārāk mazs pilnvērtīgai statistiskajai analīzei, pilnīgi izšķīlušos un dzīvo odu skaits visos traukos tiek summēts pie katras apstrādes. Šie netransformētie dati tiek testēti salīdzinājumā ar (šķīdinātāja) kontrolgrupu vai apvienoto kontrolgrupu 2 × 2 saistību tabulā.

Vairošanās

53. Vairošanās, tāpat kā potenciālā auglība, tiek aprēķināta kā oliņu virteņu skaits uz mātīti. Kopējo vienā vairošanās būrī saražoto oliņu virteņu skaitu dala ar dzīvo un neievainoto būrī ielaisto mātīšu kopējo skaitu. Potenciālās auglības *NOEC* aprēķina ar *ANOVA* metodēm, piem., Viljamsa vai Daneta testu.

54. Oliņu virteņu auglību izmanto, lai noteiktu auglīgu oliņu virteņu skaitu uz vienu mātīti. Vienā audzēšanas būrī saražoto auglīgo oliņu virteņu kopējo skaitu dala ar būrī ielaisto dzīvo un neievainoto mātīšu skaitu. Auglības *NOEC* aprēķina ar *ANOVA* metodēm, piem., Viljamsa vai Daneta testu.

Testēšanas pārskats

55. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— fizikālās un fizikālķīmiskās īpašības (šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, log K_{ow}, sadalījuma koeficients augsnē (vai sedimentos, ja pieejams), stabilitāte ūdenī un sedimentos u. c.);

— ķīmiskās identitātes dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, *CAS* numurs u. c.), iekļaujot tīrību un testējamās ķīmiskās vielas noteikšanas analītisko metodi.

Testējamās sugas:

— izmantotie testa organismi: suga, zinātniskais nosaukums, organismu izcelsmes vieta un vairošanās apstākļi;

— informācija par to, kādas darbības veiktas ar oliņām un kāpuriem;

— informācija par to, kā ar iesūcēju tika strādāts ar pirmās paaudzes izšķīlušamies pieaugušiem īpatņiem (sk. 5. papildinājumu);

— testējamo pirmās un otrās paaudzes īpatņu vecums ielaišanas brīdī testēšanas traukos.

Testēšanas apstākļi:

— testā izmantotie sedimenti, t.i., dabiskie vai formulēta sastāva (mākslīgie) sedimenti;

— dabiskie sedimenti: sedimentu paraugu ieguves atrašanās vieta un tās apraksts, ietverot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi; sedimentu raksturlielumi: pH, organiskā oglekļa saturs, C/N attiecība un granulometrija (ja vajadzīgs).

— formulētā sastāva sedimenti: sagatavošana, sastāvdaļas un raksturlielumi (organiskā oglekļa saturs, pH, mitrums utt., mērīti testa sākumā);

— testēšanas ūdens sagatavošana (ja tiek lietots rekonstituēts ūdens) un raksturlielumi (skābekļa koncentrācija, pH, cietība utt., mērīti testa sākumā);

▼**M6**

— sedimentu un virsējā ūdens slāņa dziļums testēšanas traukos un kristalizācijas traukos;

— virsējā ūdens un poru ūdens tilpums; mitro sedimentu svars ar un bez poru ūdens testēšanas traukos un kristalizācijas traukos);

— testēšanas trauki (materiāls un izmērs),

— kristalizācijas trauki (materiāls un izmērs);

— vairošanās būri (materiāls un izmērs);

— izejšķīdumu un testa koncentrāciju sagatavošanas metode (testēšanas traukiem un kristalizācijas traukiem);

— testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana testēšanas traukos un kristalizācijas traukos: testa koncentrācijas, replikātu skaits un šķīdinātāji, ja nepieciešami;

— inkubācijas apstākļi testēšanas traukos: temperatūra, gaismas cikls un intensitāte, aerācija (burbuļi sekundē);

— inkubācijas apstākļi vairošanās būros un kristalizācijas traukos: temperatūra, gaismas cikls un intensitāte;

— oliņu virteņu inkubācijas apstākļi mikroplatēs (vai citos traukos): temperatūra, gaismas cikls un intensitāte;

— detalizēta informācija par barošanu, ietverot barības veidu, sagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu.

Rezultāti:

— nominālās testa koncentrācijas, izmērītās testa koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju testēšanas un kristalizācijas traukos;

— ūdens kvalitāte testēšanas un kristalizācijas traukos – pH, temperatūra, izšķīdušais skābeklis, cietība un amonjaks;

— iztvaikojušā testēšanas ūdens aizvietošana testēšanas traukos, ja tā veikta;

— pirmās un otrās paaudzes izšķīlušos tēviņu un mātīšu odu skaits uz testēšanas trauku dienā;

— pirmās un otrās paaudzes izšķīlušos odu dzimumu attiecība uz katru apstrādi;

— par pieaugušiem īpatņiem neizšķīlušos kāpuru skaits uz testēšanas trauku, pirmajā un otrajā paaudzē;

— pirmās un otrās paaudzes izšķilšanās procentuālā daļa/daļa uz replikātu un testa koncentrāciju (tēviņi un mātītes apvienoti) pirmajai un otrajai paaudzei;

— pirmās un otrās paaudzes pilnīgi izšķīlušos un dzīvu odu vidējais attīstības ātrums uz replikātu un uz apstrādes rādītāju (tēviņi un mātītes atsevišķi un apvienoti);

— kristalizācijas traukos sadēto oliņu virteņu skaits katrā vairošanās būrī dienā;

▼**M6**

— katras oliņu virtenes raksturlielumi (izmērs, forma un auglība);

— potenciālā auglība – oliņu virteņu kopējais skaits uz vairošanās būrī ielaisto mātīšu skaitu;

— auglība – auglīgu oliņu virteņu kopējais skaits uz vairošanās būrī ielaisto mātīšu skaitu;

— toksisko beigupunktu aplēses, piem., *ECx* (un saistītie ticamības intervāli), *NOEC* un tā noteikšanai izmantotās statistikas metodes;

— rezultātu iztirzājums, minot arī jebkādas ietekmes uz testēšanas rezultātiem, kas izriet no novirzēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma C.28. nodaļa: Trīsuļodu toksicitātes tests sedimentu-ūdens sistēmā, izmantojot papildinātu ūdeni.

(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) Šā pielikuma C.27. nodaļa: Trīsuļodu toksicitātes tests sedimentu-ūdens sistēmā, izmantojot papildinātus sedimentus.

(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 Guidanceto 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. papildinājums

Definīcijas

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini.

Ķīmiskā viela ir viela vai maisījums.

Formulēta sastāva sedimenti jeb rekonstituēti, mākslīgi vai sintētiski sedimenti ir tādu materiālu maisījums, ko izmanto, lai atveidotu dabisku sedimentu fizikālās sastāvdaļas.

Virsējais ūdens ir ūdens, ar ko nosegti sedimenti testēšanas traukā.

Starpūdens jeb poru ūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp sedimentiem un augsnes daļiņām.

Papildināts ūdens ir testēšanas ūdens, kam pievienota testējamā ķīmiskā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

▼M6

2. papildinājums

Ieteikumi attiecībā uz *Chironomus riparius* kultūru

1. *Chironomus* kāpurus var audzēt kristalizācijas traukos vai lielākos konteineros. Smalkas kvarca smiltis izklāj plānā, aptuveni 5–10 mm biezā slānī konteinera apakšā. Ir pierādīts, ka kā piemērotu substrātu var izmantot *Kieselguhr* (piem., *Merck*, 8117. punkts) (pietiek ar plānu slānīti tikai dažu mm augstumā). Pēc tam pievieno piemērotu ūdeni, lai dziļums būtu vairāki cm. Ūdens līmenis ir jāpaaugstina pēc vajadzības, lai atjaunotu iztvaikojušo daudzumu un novērstu izžūšanu. Ūdeni var apmainīt, ja vajadzīgs. Jānodrošina viegla aerācija. Kāpuru audzēšanas trauki jātur piemērotā būrī, kas nepieļaus izšķīlušos pieaugušo īpatņu izbēgšanu. Būrim jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama izšķīlušos pieaugušo īpatņu spietošana, pretējā gadījumā nenotiks kopulācija (ne mazāks kā apm. 30 × 30 × 30 cm).

2. Būri jātur istabas temperatūrā vai nemainīgas vides telpā 20° ± 2 °C ar 16 stundu apgaismojuma periodu (intensitāte apm. 1 000 luksi) un 8 stundu tumsas periodu. Ir norādīts, ka gaisa mitrums zem 60 % RH var kavēt vairošanos.

Atšķaidīšanas ūdens

3. Var izmantot jebkuru piemērotu dabisku vai sintētisku ūdeni. Bieži izmanto akas ūdeni, krāna ūdeni, no kura attīrīts hlors, un mākslīgas barotnes (piem., *Elendt* M4 vai M7 barotni, sk. turpmāk). Ūdenim pirms izmantošanas jānodrošina aerācija. Ja vajadzīgs, kultivēšanas ūdeni var atjaunot, izmantoto ūdeni no kultivēšanas traukiem uzmanīgi nolejot vai sifonējot, nesadragājot kāpuru kūniņas.

Kāpuru barošana

4. *Chironomus* kāpuri ir jābaro ar zivju barības pārslām (*TetraMin*®, *TetraPhyll*® vai cita līdzīga zīmola patentētu zivju barību), katrā traukā dienā ievietojot aptuveni 250 mg. Barību var dot kā sausu samaltu pulveri vai kā suspensiju ūdenī, proti, 1 g barības pārslu pievieno 20 ml atšķaidīšanas ūdens un samaisa, līdz iegūst homogēnu maisījumu. Šo sagatavi var izbarot aptuveni 5 ml apmērā katrā traukā katru dienu (pirms lietošanas sakratīt). Vecāki kāpuri var saņemt vairāk barības.

5. Barošanu pielāgo atbilstīgi ūdens kvalitātei. Ja kultivēšanas barotne kļūst duļķaina, barošana ir jāsamazina. Barības papildinājumi ir rūpīgi jāuzrauga. Pārāk maz barības izraisīs kāpuru emigrāciju vertikālā ūdens slāņa virzienā, savukārt pārāk daudz barības izraisīs mikrobiālās aktivitātes pieaugumu un samazinās skābekļa koncentrācijas. Abas situācijas var novest pie mazākiem augšanas ātrumiem.

6. Izveidojot jaunus kultivēšanas traukus, var pievienot dažas zaļaļģu (piem., *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) šūnas.

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu barošana

7. Dažos testos ir iegūtas liecības, ka kokvilnas vates piciņa, kas piesūcināta ar piesātinātu saharozes šķīdumu, var nodrošināt barību izšķīlušamies pieaugušiem īpatņiem.

▼M6

Izšķilšanās

8. Divdesmit grādu ± 2 °C temperatūrā pieaugušie īpatņi sāks šķilties no kāpuru audzēšanas traukiem aptuveni pēc 13–15 dienām. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainajām antenām un slaidā ķermeņa.

Oliņas

9. Tiklīdz vairošanās būrī ir pieaugušie īpatņi, visi kāpuru audzēšanas trauki ir jāpārbauda 3 reizes nedēļā, lai konstatētu izdētās želatīnveidīgās oliņas. Ja tās tiek atklātas, oliņas ir uzmanīgi jāizņem. Tās ir jāievieto nelielā šķīvī, kurā ir vairošanās ūdens paraugs. Oliņas izmanto, lai izveidotu jaunus kultivēšanas traukus (piem., 2–4 oliņu kopas katrā traukā), vai tās izmanto toksicitātes testēšanā.

10. Pirmās attīstības stadijas kāpuriem būtu jāizšķiļas pēc 2 – 3 dienām.

Jaunu kultivēšanas trauku iekārtošana

11. Pēc tam, kad ir izveidotas kultūras, katru nedēļu vai retāk var izveidot jaunu kāpuru kultivēšanas trauku atkarībā no testēšanas prasībām, un vecos traukus izņem no būriem pēc pieaugušo īpatņu izšķilšanās. Ar šādu sistēmu var nodrošināt regulāru pieaugušo īpatņu piegādi ar minimāliem pārvaldības pasākumiem.

Testēšanas šķīdumu M4 and M7 sagatavošana

12. *Elendt* (1990) ir aprakstījis M4 barotni. M7 barotni sagatavo tāpat kā M4 barotni, izņemot 1. tabulā norādītās vielas, kurām koncentrācijas M7 barotnē ir 4 reizes mazākas nekā M4 barotnē. Testēšanas šķīdumu nevajadzētu sagatavot saskaņā ar *Elendt and Bias* (1990), jo $NaSiO_3$, $5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 un K_2HPO_4 koncentrācijas, kas norādītas izejšķīdumu sagatavošanai, ir nepiemērotas.

M7 barotnes sagatavošana

13. Katru izejšķīdumu (I) sagatavo atsevišķi un apvienoto izejšķīdumu (II) pagatavo no šiem izejšķīdumiem (I) (sk. 1. tabulu). 50 ml no katra apvienotā izejšķīduma (II) un 2. tabulā norādītos daudzumus no katra makroelementu izejšķīduma iemaisa 1 litrā dejonizēta ūdens, lai sagatavotu M7 barotni. Vitamīnu izejšķīdumu sagatavo, pievienojot 3 vitamīnus dejonizētam ūdenim, kā norādīts 3. tabulā, un neilgi pirms izmantošanas galīgajai M7 barotnei pievieno 0,1 ml apvienotā vitamīnu izejšķīduma. Vitamīnu izejšķīdumu glabā sasaldētu mazās alikvotās. Barotnei nodrošina aerāciju un to stabilizē.

1. tabula

Barotnes M4 un M7 mikroelementu izejšķīdumi

Izejšķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto izejšķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos izejšķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Gala koncentrācijas testa šķīdumos (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
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**

Izejšķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto izejšķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos izejšķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Gala koncentrācijas testa šķīdumos (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
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
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Šīs vielas atšķiras M4 barotnē un M7 barotnē, kā norādīts iepriekš.
(2) Šos šķīdumus sagatavo atsevišķi, pēc tam salej kopā un nekavējoties liek autoklāvā.

2. tabula

Makroelementu izejšķīdumi barotnei M4 un M7

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makroelementu izejšķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un 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
KCl	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**

3. tabula

Vitamīnu izejšķīdums barotnei M4 un M7

Visus trīs vitamīnu šķīdumus apvieno, lai sagatavotu vienu vitamīnu izejšķīdumu.

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Vitamīnu izejšķīduma tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
Tiamīna hidrohlorīds	750	0,1	0,075
Ciānkobalamīns (B12)	10	0,1	0,0010
Biotīns	7,5	0,1	0,00075

ATSAUCES

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. papildinājums

Formulēta sastāva sedimentu sagatavošana

SEDIMENTU SASTĀVS

Formulēta sastāva sedimentu sastāvam jābūt šādam:

Sastāvdaļa	Raksturlielumi	% no sedimentu saussvara
Kūdra	Sfagnu kūdra, kuras pH ir pēc iespējas tuvāks 5,5–6,0 vērtībai, bez redzamām augu atliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs: ≤ 1 mm) un izžāvēta ar gaisu	4 – 5
Kvarca smiltis	Smilšu graudu izmērs: > 50 % no daļiņām jābūt diapazonā 50–200 μm	75 – 76
Kaolīna māli	Kaolīna saturs: ≥ 30 %	20
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdru un smiltis	2 (± 0,5)
Kalcija karbonāts	$CaCO_3$, pulverizēts, ķīmiski tīrs	0,05 – 0,1
Ūdens	Vadītspēja: ≤ 10 μS/cm	30 – 50

SAGATAVOŠANA

Kūdru izžāvē gaisā un samaļ smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH koriģē ar $CaCO_3$ līdz 5,5 ± 0,5 vērtībai. Suspensiju kondicionē vismaz 2 dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobiālo sastāvdaļu. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt 6 ± 0,5. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu homogēnus sedimentus ar ūdens saturu 30–50 % diapazonā no sedimentu sausā svara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un to koriģē 6,5–7,5 vērtībā ar $CaCO_3$, ja vajadzīgs. Ņem sedimentu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Pēc tam, pirms formulēta sastāva sedimentus izmanto trīsuļodu toksicitātes testos, ir ieteicams tos kondicionēt 7 dienas tādos pašos apstākļos, kādi būs testā.

GLABĀŠANA

Mākslīgo sedimentu sausās sastāvdaļas var arī uzglabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Izstrādātos (mitros) sedimentus nedrīkstētu uzglabāt pirms to izmantošanas testā. Tie ir jāizmanto tūlīt pēc 7 dienu nogatavināšanas perioda, kas pabeidz to sagatavošanu.

ATSAUCES

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. papildinājums

Piemērota atšķaidīšas ūdens ķīmiskie raksturlielumi

SASTĀVDAĻA	KONCENTRĀCIJAS
Cietās daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
$CaCO_3$ cietība	< 400 mg/l (*)
Hlora atlikums	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenilu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

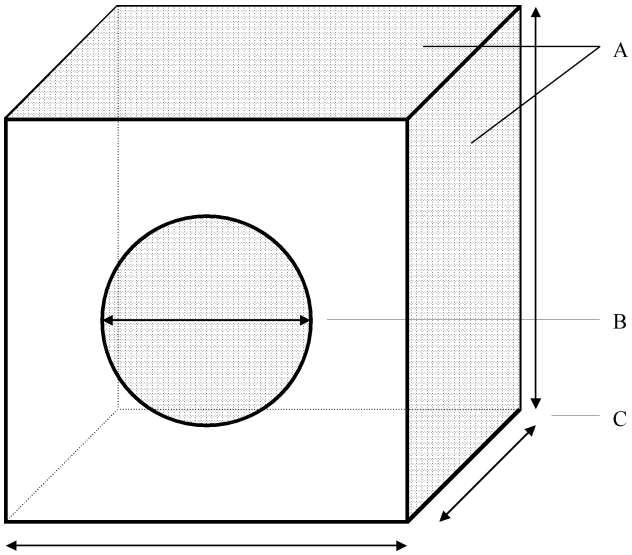
(*) Tomēr jānorāda, ka, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4).

▼**M6**

5. papildinājums

Norādījumi testa veikšanai

Audzēšanas būra piemērs:



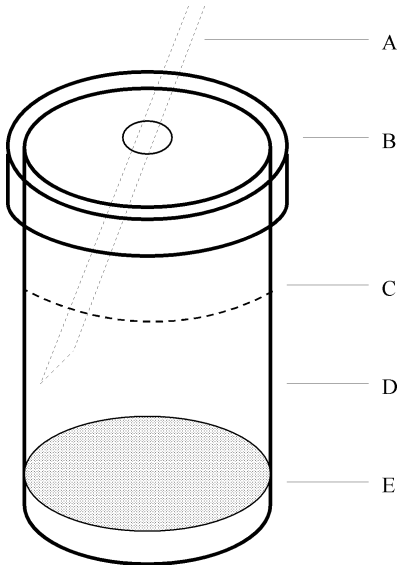
A: siets būra augšā un vismaz vienā sānā (sieta acu izmērs apmēram 1 mm);

B: atvērums, pa kuru būrī ielikt izšķīlušos pieaugušos kukaiņus un izņemt izdētās oliņu virtenes no kristalizācijas traukiem (nav parādīts šajā attēlā);

C: vairošanās būra izmērs: vismaz 30 cm garumā, 30 cm augstumā, 30 cm platumā.

▼**M6**

Testēšanas trauka piemērs:



A: Pastēra pipete gaisa piegādāšanai virsējā ūdenī;

B: stikla vāks, lai novērstu izšķīlušos odu izbēgšanu;

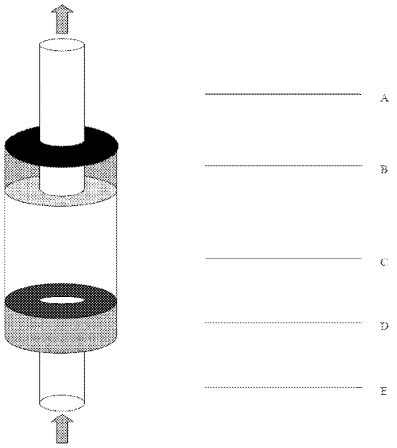
C: ūdens līmenis;

D: testēšanas trauks (vismaz 600 ml tilpuma vārglāze);

E: sedimentu slānis.

▼**M6**

Piemērs – iesūcējs pieaugušo īpatņu noķeršanai (bultas norāda gaisa plūsmas virzienu):



A: stikla caurule (iekšējais diametrs apmēram 5 mm), savienota ar pašuzsūcošu sūkni;

B: vulkanizētas gumijas aizbāznis, caurdurts ar stikla cauruli (A). Stikla caurules (A) atvērums iekšpusē ir pārklāts ar kokvilnas audumu un ar sietu (sieta acs izmērs apmēram 1 mm), lai novērstu iesūcējā iesūkto odu savainošanu;

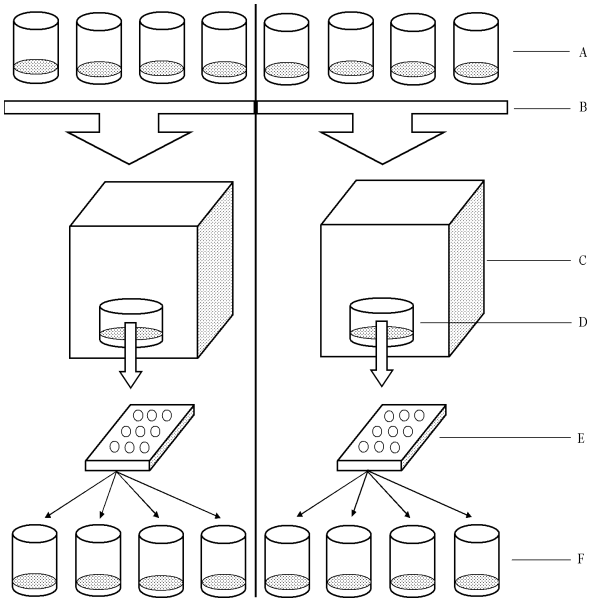
C: caurspīdīgs konteiners (plastmasa vai stikls, garums apmēram 15 cm) noķertajiem odiem;

D: vulkanizētas gumijas aizbāznis, caurdurts ar cauruli (E). Lai izlaistu odus vairošanās būrī, aizbāznis D tiek izņemts no konteinera C;

E: caurule (plastmasas vai stikla, diametrs apmēram 8 mm), lai savāktu pieaugušos īpatņus no trauka.

▼**M6**

Dzīves cikla shēma:



A: Pirmā paaudze – testēšanas trauki ar sedimentu-ūdens sistēmu, 8 replikāti, 20 pirmās attīstības stadijas kāpuri uz trauku;

B: četri testēšanas trauki katrā vairošanās būrī – A un B;

C: vairošanās būri (A un B), kuros notiek izlidošana, pārošanās un olu dēšana;

D: kristalizācijas trauki oliņu virteņu dēšanai;

E: mikroplates, katrai oliņu virtenei viens iedobums;

F: otrā paaudze – testēšanas trauki ar sedimentu-ūdens sistēmu, astoņi replikāti, 20 pirmās attīstības stadijas kāpuri uz katru trauku.

▼M6

C.41. ZIVJU DZIMUMATTĪSTĪBAS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (*TG*) 234 (2011. gads). Tā balstīta uz 1998. gada lēmumu izstrādāt jaunas testēšanas metodes vai atjaunināt esošās potenciālo endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanai un testēšanai. Zivju dzimumattīstības tests (*FSDT*) ir atzīts par daudzsološu testēšanas metodi, kas aptver tās jutīgās zivju attīstības stadijas, kuras atbild uz estrogēniem un androgēniem līdzīgām ķīmiskajām vielām. No 2006. līdz 2010. gadam testēšanas metodei veikta starplaboratoriju salīdzinošā testēšana, kurā par derīgām atzītas: rīsa zivs jeb Japānas medaka (*Oryzias latipes*), zebrzivs (*Danio rerio*) un trīsadatu stagars (*Gasterosteus aculeatus*), bet biezpaura grundulis (*Pimephales promelas*) atzīts par daļēji derīgu (41)(42)(43). Šajā protokolā iekļauta Japānas medaka, trīsadatu stagars un zebrzivs. Protokols ir papildinājums ESAO *TG* 210 Zivju mazuļu toksicitātes testam (1), kur ekspozīcija tiek turpināta līdz zivju dzimumu diferenciācijai, t.i., aptuveni 60 dienas pēc izšķilšanās (*dph*) Japānas medakai, trīsadatu stagaram un zebrzivij (ekspozīcijas laiks var būt īsāks vai garāks citām sugām, kuru derīgums testam vēl tiks noskaidrots), un testa mērījumu beigupunktos ir iekļauti ar endokrīnās sistēmas jutīgumu saistīti parametri. *FSDT* novērtē varbūtēji endokrīnajai sistēmai nelabvēlīgu ķīmisku vielu (piem., estrogēnu, androgēnu un steroīdu ģenēzes inhibitoru) potenciāli nelabvēlīgu ietekmi uz agrīnajām attīstības stadijām un dzimumattīstību. Testējamās ķīmiskās vielas darbības veida parādīšanai tiek izmantota divu pamata endokrīno beigupunktu kombinācija – vitellogenīna (*VTG*) koncentrācija un fenotipiskā dzimumu attiecība. Saistībā ar fenotipiskā dzimuma attiecību maiņu populācijas mērogā, *FSDT* tests var tikt izmantots bīstamības un riska novērtēšanai. Ja tests tiek izmantots bīstamības vai riska novērtējumam, to nevajadzētu veikt ar stagaru, pagaidām pieejamie validācijas dati liecina, ka šai sugai ļoti reti mainās fenotipiskās dzimuma attiecības testējamās ķīmiskās vielas ietekmē.

2. Testa procedūra balstīta uz to, ka ūdens vidē zivis pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai dzimumattīstībai labilā periodā, kurā ir sagaidāms, ka zivis būs visjūtīgākās uz tādām endokrīno sistēmu traucējošām ķīmiskām vielām, kas ietekmē dzimumattīstību. *VTG* koncentrācijas un dzimumu attiecības (dzimumu pārstāvju proporcijas) ir divi galvenie beigupunkti, kuri tiek mērīti kā indikatori ar endokrīno sistēmu saistītiem traucējumiem, un tos nosaka ar gonādu histoloģijas metodi. Gonādu histopatoloģija (oocītu un spermatoģenēzes šūnu novērtēšana un klasificēšana) ir ieteicama, bet nav obligāta. Ja iespējams, papildus tiek noteikts arī ģenētiskais dzimums (piem., Japānas medakai un trīsadatu stagaram). Ģenētisku dzimummarķieru esība ir nozīmīga priekšrocība, jo tā palielina dzimumu attiecības statistikas ietekmi un padara iespējamu individuālas fenotipiskā dzimuma apvērses detektēšanu. Citi apikālie beigupunkti ir izšķilšanās ātrums, izdzīvotība, ķermeņa garums un svars. Testēšanas metode var tikt pielāgota citām sugām, kuras nav iepriekš minētas, ja: tām tiek veikta validācija līdzīga tai, kas veikta ar Japānas medaku, trīsadatu stagaru un zebrzivi; ja kontrolgrupas zivju dzimums tiek noteikts testa beigās; ja *VTG* līmenis ir pietiekami augsts, lai varētu konstatēt būtiskas ar ķīmisko vielu saistītas atšķirības; ja testēšanas sistēmas jutība tiek nodrošināta izmantojot endokrīni aktīvas ķīmiskās standartvielas (estrogēnus, antiestrogēnus, androgēnus, antiandrogēnus, aromatāzes inhibitorus u. c.). Jebkādi validācijas ziņojumi, kuros tiek aprakstīti *FSDT* dati, izmantojot citas sugas, ir jāpārskata ESAO, un jāizvērtē, vai validācijas rezultāti ir uzskatāmi par pietiekamiem.

▼M6

Sākotnējie apsvērumi un ierobežojumi

3. *VTG* parasti tiek ražots oldējēju mugurkaulnieku mātīšu aknās, un tā ir atbildes reakcija uz cirkulējošo endogēno estrogēnu (2). Tas ir olu dzeltenumu proteīnu veidošanās priekšnoteikums; kad tas ir saražots aknās, tas ar asins plūsmu nokļūst olnīcās, kur tiek uzņemts un, ikriem attīstoties, modificēts. Zivju mazuļiem un pieaugušiem zivju tēviņiem *VTG* sintēze ir ļoti neliela, jo tiem nav pietiekamā daudzumā cirkulējoša estrogēna, taču konstatējama. Tomēr aknas spēj sintezēt un veikt *VTG* sekrēciju arī eksogēnas estrogēnu stimulācijas gadījumā (3)(4)(5).

4. *VTG* mērījumi ļauj detektēt ķīmiskās vielas ar estrogēnu, antiestrogēnu, androgēnu iedarbību, kā arī ķīmiskās vielas, kas traucē steroīdu ģenēzi, piem., aromatāzes inhibitorus. Estrogēno ķīmisko vielu detektēšana ir iespējama, mērot *VTG* indukciju zivju tēviņiem, un tā ir plaši aprakstīta zinātniskajā recenzētajā literatūrā. Ir pierādīts, ka *VTG* indukcija notiek arī pēc ekspozīcijas aromatizējamiem androgēniem (6)(7). Cirkulējošo estrogēnu līmeņa samazinājums mātītēm, piem., inhibējot aromatāzes, kas pārvērš endogēno androgēnu par dabisko estrogēnu 17β-estadiolu, izraisa *VTG* koncentrācijas samazinājumu; tas savukārt tiek izmantots, lai noteiktu ķīmiskās vielas, kurām ir aromatāzes inhibējošas īpašības, jeb vispārinot, kuras ir steroīdu ģenēzes inhibitori (33). *VTG* atbildes reakcijas bioloģiskais būtiskums pēc estrogēnās/aromatāzes inhibēšanas ir konstatēts un plaši dokumentēts (8)(9). Tomēr iespējams, ka *VTG* ražošanu mātītēm ietekmē arī vispārīgais toksiskums un neendokrīnas toksiskas darbības veidi.

5. Ir veiksmīgi izstrādātas un standartizētas vairākas mērījumu metodes rutinētai lietošanai, lai kvantificētu *VTG* asinīs, aknās, visa ķermeņa vai galvas/astes homogenizētos paraugos, kas ievākti no individuālām zivīm. Tas attiecas uz zebrzivi, trīsadatu stagaru un Japānas medaku, kā arī uz daļēji validēto sugu biezpaura grunduli; tām ir pieejamas sugai specifiskas imūnfermentatīvās analīzes (ELISA) testēšanas metodes, kurās *VTG* kvantifikācijai izmanto imunoķīmiju (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). Japānas medakai un zebrzivij ir laba korelācija starp *VTG* mērījumiem asins plazmā, aknās un homogenizētos paraugos, kaut gan homogenizētajos paraugos parasti ir nedaudz zemāki *VTG* rezultāti nekā asins plazmā (17)(18)(19). 5. papildinājumā aprakstītas *VTG* analīzēm nepieciešamo paraugu ņemšanas procedūras.

6. Izmaiņas fenotipiskajā dzimumu attiecībā (dzimumu proporcijā) ir beigupunkts, kas atspoguļo dzimumu apvērsi. Principā estrogēni, antiestrogēni, androgēni, antiandrogēni un steroīdģenēzi inhibējošās ķīmiskās vielas var ietekmēt attīstošos zivju dzimumu attiecību (20). Konstatēts, ka dzimumu apvērse pēc ekspozīcijas estrogēniem līdzīgām ķīmiskām vielām ir daļēji atgriezeniska zebrzivij (21), turpretī dzimumu apvērse pēc ekspozīcijas androgēniem līdzīgām ķīmiskām vielām ir neatgriezeniska (30). Dzimumi tiek definēti kā tēviņš, mātīte, starpdzimums (gonādā gan oocīti, gan spermatoģenēzes šūnas) un nediferencēts dzimums, noteikts individuālai zivij gonādu histoloģiskajā pārbaudē. Norādījumi ir sniegti 7. papildinājumā un ESAO Norādījumu dokumentā *Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22).

7. Ģenētiskais dzimums tiek noteikts, izmantojot ģenētiskos marķierus, ja konkrētajai sugai tādi ir. Japānas medakai mātīšu XX vai tēviņu XY hromosomas var noteikt, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (*PCR*), vai arī analizēt ar Y hromosomu saistītā *DM* domēna gēnu (*DMY*) (*DMY* ir vai nav), kā aprakstīts (23)(24). Trīsadatu stagaram ir *PCR* ekvivalenta metode

▼M6

ģenētiskā dzimuma noteikšanai, un tā aprakstīta 10. papildinājumā. Gadījumos, kad ģenētiskais dzimums var tikt individuāli saistīts ar fenotipisko dzimumu, testa jauda tiek uzlabota, un tādēļ ģenētiskais dzimums jānosaka sugām ar labi aprakstītiem ģenētiskajiem dzimuma marķieriem.

8. Divi galvenie beigupunkti – *VTG* un dzimumu attiecība – kombinācijā var parādīt ķīmiskās vielas endokrīno darbības veidu (*MOA*) (1. tabula). Dzimumu attiecība ir ar populāciju saistāms biomarķieris (25)(26), un dažiem labi definētiem darbības veidiem *FSDT* rezultātus var izmantot bīstamības un riska novērtēšanai, ja pārraugošā aģentūra tos uzskata par piemērotiem. Pašlaik šie darbības veidi ir estrogēni, androgēni un steroīdģenēzes inhibitori.

1. tabula

Endokrīno beigupunktu reakcija uz ķīmisko vielu dažādiem darbības veidiem:

↑= pieaug, ↓= samazinās, — = nav pētīts.

MOA	*VTG* ♂	*VTG* ♀	Dzimumu attiecība	Atsauces
Vājš estrogēnu agonists	↑	↑	↑♀ vai ↑nediferencēts	(27) (40)
Spēcīgs estrogēnu agonists	↑	↑	↑♀ vai ↑nediferencēts, nav ♂	(28) (40)
Estrogēnu antagonists	—	—	↓♀, ↑nediferencēts	(29)
Androgēnu agonists	↓ vai —	↓ vai —	↑ ♂, nav ♀	(28) (30)
Androgēnu antagonists	—	—	↑♀, ↑starpdzimumu	(31)
Aromatāzes inhibitors	↓	↓	↓♀	(33)

9. *FSDT* neietver zivs reproduktīvās dzīves posmu, tādēļ ķīmiskās vielas, kuras zemākās koncentrācijās potenciāli varētu ietekmēt vairošanos un pēc tam dzimumattīstību, jāpārbauda testā, kas ietver vairošanos.

10. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

11. *In vivo FSDT* ir paredzēts, lai noteiktu ķīmiskas vielas ar androgēnām un estrogēnām īpašībām, kā arī antiandrogēnus, antiestrogēnus un steroīdu ģenēzi inhibējošām īpašībām. *FSDT* validācijas stadijas (1 un 2) neietver estrogēnās, androgēnās un steroīdu ģenēzi inhibējošās ķīmiskās vielas. Estrogēnu antagonistu un androgēnu antagonistu izpausmes *FSDT* testā ir redzamas 1. tabulā; *MOA* pagaidām ir mazāk dokumentēti.

TESTA PRINCIPS

12. Testā zivis eksponē vismaz trijām ūdenī izšķīdinātas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām, laikposmā no nupat apaugļotiem ikriem līdz dzimuma diferenciācijas beigām. Tests notiek caurplūdes apstākļos, izņemot gadījumus, kad tas nav iespējams testējamās ķīmiskās vielas pieejamības vai īpašību (piem., slikta šķīdība) dēļ. Tests sākas ar nupat apaugļotu ikru (pirms blastulas izveidošanās) ievietošanu testa kamerās. Kameru noslogojums katrai sugai ir aprakstīts 27. punktā. Validētajām zivju sugām – Japānas medakai, trīsadatu stagaram un zebrzivij – testu beidz 60 dienas pēc izšķilšanās. Pēc testa beigām zivis tiek humāni eitanazētas. Bioloģiskie

▼M6

paraugi (asins plazma, aknas vai galvas/astes homogenizēts paraugs) *VTG* analīzēm tiek ievākti no katras zivs; atlikusī daļa tiek paredzēta gonādu histoloģiskam novērtējumam, lai noteiktu fenotipisko dzimumu; pēc izvēles var tikt veikta histopatoloģija (piem., gonādu attīstības stadijas, starpdzimumu izteiktība). Sugām, kurām raksturīgi attiecīgi marķieri, ģenētiskā dzimuma noteikšanai tiek ievākts bioloģiskais paraugs (anālā vai muguras spura) (9. un 10. papildinājums).

13. Validētajām sugām – Japānas medakai, trīsadatu stagaram un zebrzivij – piemērotie testēšanas apstākļi aprakstīti 2. papildinājumā.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

14. Jābūt pieejamiem rezultātiem no akūtās toksicitātes testiem vai citiem īstermiņa toksicitātes testiem [piem., testēšanas metode C.14 (34) un ESAO 210 (1)], kas, vēlams, ir veikti ar testam izvēlēto sugu. Tas nozīmē, ka jābūt zināmai testējamās vielas šķīdībai ūdenī un tvaika spiedienam un jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar kuru noteikt ķīmiskās vielas daudzumu testa kamerās, ar zināmu un aprakstītu precizitāti un detektēšanas robežu.

15. Cita noderīga informācija ir struktūras formula, ķīmiskās vielas tīrība, stabilitāte ūdenī un gaismā, pKa, P_{ow} un tūlītējas bionoārdāmības testa rezultāti (testēšanas metode C.4) (35).

Testa pieņemamības kritēriji

16. Lai testa rezultāti tiktu atzīti par pieņemamiem, tiem piemēro šādus nosacījumus:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (*ASV*) visa testa laikā;

— ūdens temperatūra testa kamerās visā ekspozīcijas periodā nedrīkst atšķirties vairāk kā par ± 1,5 °C, un tā jāuztur testējamajai sugai norādītajā temperatūras diapazonā (2. papildinājums);

— ir jābūt pieejamai validētai testējamās ķīmiskās vielas analīzes metodei ar detektēšanas robežu stipri zem zemākās nominālās koncentrācijas, un ir jāsavāc pierādījumi, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas šķīdumos ir apmierinoši uzturētas vidējo mērīto vērtību ± 20 % robežās;

— apaugļoto ikru kopējā izdzīvotība kontrolgrupā un, vajadzības gadījumā, šķīdinātāja kontrolgrupā ir lielāka vai vienāda ar 2. papildinājumā definētajiem robežlielumiem;

— pieņemamības kritēriji, kas testa beigās saistīti ar augšanu un dzimumu attiecību, ir balstīti uz datiem no kontrolgrupām (apvienotas šķīdinātāja un ūdens kontrolgrupas, izņemot gadījumus, kad tās būtiski atšķiras; tad tikai šķīdinātāja kontrolgrupa):

▼M6

		Japānas medaka	Zebrzivs	Trīsadatu stagars
Augšana	Zivs mitrais svars pēc nosusināšanas	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Garums (standarta garums)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Dzimumu attiecība (% tēviņi vai mātes)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Ja izmanto šķīdinātāju, tam nevajadzētu statistiski būtiski ietekmēt izdzīvotību un tas nedrīkstētu izraisīt jebkādus endokrīnās sistēmas traucējumus vai citu šķīdinātāja kontrolē konstatētu nelabvēlīgu ietekmi uz zivju mazuļiem.

Ja novēro novirzes no testa pieņemamības kritērijiem, jāapsver saistība ar testa datu uzticamību un šie apsvērumi ir jāiekļauj testēšanas pārskatā.

TESTA METODES APRAKSTS

Testa kameras

17. Var lietot jebkuru stikla, nerūsējošā tērauda vai citas ķīmiski inertas vielas kameru. Kameras izmēriem jābūt pietiekami lieliem, lai atbilstu tālāk aprakstītajiem noslogojuma rādītājiem. Vēlams, lai testa kameras būtu brīvi izvietotas testēšanas vietā. Pēc nejaušības principa izvietotu katras koncentrācijas grupu izkārtojums ir vēlamāks nekā izkārtojums pilnībā pēc nejaušības principa. Testa kameras jāaizsargā no nevēlamiem traucējumiem.

Sugu izvēle

18. Ieteicamās zivju sugas ir uzskaitītas 2. papildinājumā. Jaunu sugu iekļaušanas pasākumi ir aprakstīti 2. punktā.

Vecākzivju turēšana

19. Detalizēti ieteikumi vecākzivju turēšanai atrodami ESAO *TG* 210 (1). Vecākzivis ir jābaro vienu vai divas reizes dienā ar piemērotu barību.

Darbības ar embrijiem un kāpuriem

20. Sākumā embrijus un kāpurus var eksponēt galvenajā kamerā, ievietotus mazākās stikla vai nerūsējošā tērauda kamerās, kas sānos vai galos aprīkotas ar sietu, kurš ļauj testējamajai vielai plūst cauri kamerai. Lai nodrošinātu cauri šīm mazajām kamerām plūstošu straumi, kas nav turbulenta, kameras var iekarināt statīvā, kuru kustina uz augšu un leju tā, lai dzīvnieki vienmēr atrastos zem ūdens.

21. Kad ikru konteineri, režģi un sieti jau ir izmantoti, lai noturētu ikrus galvenajā testa kamerā, pēc kāpuru izšķilšanās šie šķēršļi ir jānoņem, atstājot vienīgi sietus, kas nepieciešami, lai novērstu zivju izbēgšanu. Ja nepieciešams pārvietot kāpurus, tie nedrīkst saskarties ar gaisu, un zivju izņemšanai no ikru konteineriem nevajadzētu lietot tīkliņus. Pārvietošanas laiks ir atkarīgs no sugas, un pārvietošana nav vienmēr nepieciešama.

▼M6

Ūdens

22. Par testēšanas ūdeni var izmantot jebkuru ūdeni, kurā kontrolgrupas izdzīvotība ir vismaz tik augsta, kā 3. papildinājumā aprakstītajā ūdenī. Visā testa laikā ūdens kvalitātei jāsaglabājas nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens nevajadzīgi neietekmē testa rezultātus (piem., reaģējot ar testējamo ķīmisko vielu) vai negatīvi neietekmē vaislas zivis, noteiktos intervālos ir jāņem analizējami paraugi. Ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte bijusi relatīvi konstanta, kopējais organiskais ogleklis, vadītspēja, pH un suspendētās cietās daļiņas jānosaka, piem., reizi trijos mēnešos. Ja ir šaubas par ūdens kvalitāti, ir jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), galveno anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) un pesticīdu analīzes. Sīkāka informācija par ķīmiskajām analīzēm un ūdens ņemšanu sniegta 34. punktā.

Testēšanas šķīdumi

23. Ja vien tas praktiski iespējams, jāizmanto caurplūdes sistēma. Šādā gadījumā ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās vielas izejšķīdumu (piem., dozējošais sūknis, proporcionālais atšķaidītājs, piesātināšanas sistēma), lai testa kamerām piegādātu nepieciešamo koncentrāciju virkni. Testa laikā noteiktos intervālos ir jāpārbauda izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens plūsmas ātrumi, testa laikā tie nedrīkst mainīties vairāk nekā par 10 %. Par piemērotu ir atzīts plūsmas ātrums, kas vienāds vismaz ar piecu testa kameru tilpumiem 24 stundās (1). Jācenšas izvairīties no plastmasas caurulēm un citiem materiāliem, kuri var saturēt bioloģiski aktīvas ķīmiskas vielas vai var adsorbēt testējamo ķīmisko vielu.

24. Izejšķīdumu vēlams sagatavot bez šķīdinātāju izmantošanas, vienkārši maisot vai kratot testējamo vielu atšķaidīšanas ūdenī, izmantojot mehāniskus palīglīdzekļus (piem., maisīšanu vai ultraskaņu). Ja testējamo ķīmisko vielu ir grūti izšķīdināt ūdenī, jāizmanto ESAO Norādījumu dokumentā par sarežģītu vielu un maisījumu toksicitātes ūdens vidē testēšanu (36) aprakstītās procedūras. Ir jāizvairās no šķīdinātāju izmantošanas, tomēr tie var būt nepieciešami atsevišķos gadījumos, lai pagatavotu vajadzīgās koncentrācijas izejšķīdumu. Piemērotu šķīdinātāju piemēri doti atsaucē (36).

25. Būtu jāizvairās no pusstatiskiem testa apstākļiem, izņemot gadījumus, kad sniegts pārliecinošs pamatojums, kas saistīts ar testējamo ķīmisko vielu (piem., stabilitāte, ierobežota pieejamība, augsta cena vai bīstamība). Pusstatiskajai sistēmai var izmantot divas atšķirīgas ūdens nomaiņas procedūras. Vai nu tīrās kamerās pagatavo jaunus testējamās vielas šķīdumus un izdzīvojušos ikrus un kāpurus uzmanīgi pārceļ uz jaunajām kamerām, vai arī testa dzīvnieki paliek testēšanas kamerās, kamēr katru dienu tiek nomainīta daļa testēšanas ūdens (vismaz divas trešdaļas).

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Ikru vākšana un tās ilgums

26. Lai izvairītos no neobjektivitātes ģenētisku iemeslu dēļ, ikri tiek vākti no vismaz trim vaislas pāriem vai grupām, tie tiek sajaukti un testam izvēlēti pēc nejaušības principa. Trīsadatu stagara mākslīgās apaugļošanas apraksts atrodams 11. papildinājumā. Tests jāsāk iespējami agri pēc ikru apaugļošanas – embrijus vēlams ielikt testēšanas šķīdumā pirms blastulu dalīšanās

▼M6

sākuma vai pēc iespējas drīzāk pēc šīs stadijas sākuma, bet ne vēlāk kā 12 stundas pēc apaugļošanas. Tests turpinās tik ilgi, kamēr kontrolgrupā ir beigusies dzimumdiferenciācija (60 dienas pēc izšķilšanās Japānas medakai, trīsadatu stagaram un zebrzivij).

Noslogojums

27. Testa sākumā jābūt vismaz 120 apaugļotiem ikriem uz katru koncentrāciju, tie jāsadala uz vismaz 4 replikātiem (pieļaujama kvadrātsaknes sadale kontrolgrupā). Apstrādēm paredzētie ikri jāsadala pēc nejaušības principa (izmantojot randomizācijas statistikas tabulas). Noslogojumam (definīciju sk. 1. papildinājumā) jābūt pietiekami zemam, lai bez kameru tiešas aerācijas varētu uzturēt izšķīdušā skābekļa koncentrāciju vismaz 60 % *ASV* līmenī. Caurplūdes apstākļos notiekošiem testiem ieteikts noslogojums, kas nepārsniedz 0,5 g/l 24 stundās, un nepārsniedz 5 g/l jebkurā laikā. Ne vēlāk kā 28 dienas pēc apaugļošanas zivis ir jāsadala starp replikātiem tā, lai visos replikātos ir tik vienāds zivju skaits, cik vien iespējams. Ja ekspozīcijas dēļ vērojama mirstība, replikātu skaits ir jāsamazina tā, lai zivju skaits starp apstrādes līmeņiem tiktu uzturēts iespējami vienāds.

Gaisma un temperatūra

28. Fotoperioda ilgumam un ūdens temperatūrām jābūt piemērotām testā izmantotajām sugām (*FSDT* eksperimenta apstākļus sk. 2. papildinājumā).

Barošana

29. Barība un barošana ir ļoti nozīmīga, un svarīgi, lai katras stadijas dzīvnieki tiek baroti atbilstošos laika intervālos un normālai augšanai nepieciešamajos daudzumos. Barošanai vajadzētu būt *ad libitum*, vienlaikus izvairoties no pārpalikumiem. Lai panāktu pietiekamu augšanas ātrumu, zivis jābaro vismaz divreiz dienā (pieļaujama barošana vienreiz dienā nedēļas nogalēs), un starp ēdināšanas reizēm jābūt vismaz trīs stundu intervālam. Lai novērstu atkritumu uzkrāšanos, nepieciešamības gadījumā ir jānovāc liekā barība un fekālijas. Balstoties uz pieredzi barība un barošanas režīms ir pastāvīgi jāprecizē, lai uzlabotu izdzīvotību un optimizētu augšanu. Jādara viss iespējamais, lai plānoto režīmu saskaņotu ar atzītiem ekspertiem. Barošana jāpārtrauc 24 stundas pirms testa beigām. Atbilstošu barību piemēri ir uzskaitīti 2. papildinājumā (sk. arī ESAO Zivju testēšanas pamatnostādnes (39)).

Testa koncentrācijas

30. Intervāli starp testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijām ir aprakstīti 4. papildinājumā. Minimums ir trīs testa koncentrācijas ar vismaz četriem replikātiem. Izvēloties testa koncentrāciju diapazonu, jāņem vērā akūtās toksicitātes pētījumos iegūtā līkne, kas attēlo LC_{50} atkarību no ekspozīcijas laika. Ja rezultātus plānots izmantot riska novērtēšanai, ieteicams izmantot piecas testa koncentrācijas.

31. Ķīmiskās vielas koncentrācijām, kas augstākas par 10 % no akūtajām pieaugušo dzīvnieku LC_{50} vai 10 mg/l – mazākais lielums no šiem abiem nav jātestē. Maksimālā testa koncentrācija ir 10 % no LC_{50} kāpuru/mazuļu periodā.

▼M6

Kontrolgrupas

32. Papildus testa koncentrācijām ir jātestē arī atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupa (≥ 4 replikāti) un, ja tiek lietots šķīdinātājs, arī šķīdinātāja kontrolgrupa (≥ 4 replikāti). Testā var tikt izmantoti tikai tādi šķīdinātāji, par kuriem ir noskaidrots, ka tiem nav nekādas būtiskas ietekmes uz testa beigupunktiem.

33. Ja tiek izmantots šķīdinātājs, tā gala koncentrācija nedrīkstētu būt augstāka par 0,1 ml/l (36) un tā koncentrācijai jābūt vienādai visās testa kamerās, izņemot atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Tomēr jāpieliek visas pūles, lai izvairītos no šķīdinātāju izmantošanas vai samazinātu šķīdinātāju koncentrācijas līdz minimālajām.

Analītiskās noteikšanas un mērījumu biežums

34. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas ķīmiskā analīze ir jāveic pirms testa sākuma, lai pārbaudītu atbilstību pieņemamības kritērijiem. Visi replikāti jāanalizē individuāli testa sākumā un testa beigās. Uz katru testa koncentrāciju viens replikāts ir jāanalizē vismaz reizi nedēļā testa laikā, sistemātiski mainot analizējamos replikātus (1,2,3,4,1,2…). Ja paraugi tiek saglabāti vēlākai analīzei, paraugu uzglabāšanas metodēm jābūt iepriekš validētām. Paraugus nepieciešams filtrēt (piem., izmantojot poru lielumu 0,45 μm) vai centrifugēt, lai nodrošinātu, ka analīze tiek veikta ar ķīmiski tīru šķīdumu.

35. Testa laikā visās testa kamerās ir jāmēra izšķīdušais skābeklis, pH, kopējā cietība, sāļums (ja attiecināms) un temperatūra. Minimālajā variantā izšķīdušais skābeklis, sāļums (ja attiecināms) un temperatūra ir jānosaka reizi nedēļā, pH, vadītspēja un cietība jānosaka testa sākumā un beigās. Vēlams, lai vismaz vienā testa kamerā tiktu nepārtraukti novērota temperatūra.

36. Rezultāti jābalsta uz izmērītajām koncentrācijām. Taču, ja visā testa laikā testējamās koncentrācijas ir apmierinoši uzturētas ± 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, tad rezultātus var balstīt vai nu uz nominālajām, vai arī uz izmērītajām vērtībām.

Novērojumi un mērījumi

Embrionālās attīstības stadija

37. Ekspozīcija jāuzsāk iespējami ātri pēc apaugļošanas un pirms blastulu dalīšanās sākuma, ne vairāk kā 12 stundas pēc apaugļošanas, lai nodrošinātu ekspozīciju agrīnās embrionālās attīstības laikā.

Izšķilšanās un izdzīvotība

38. Novērojumi par izšķilšanos un izdzīvotību jāizdara vismaz reizi dienā, skaits jāprotokolē. Miruši embriji, kāpuri un zivju mazuļi ir jāaizvāc pēc iespējas ātrāk, jo tie var ātri noārdīties vai tikt sadalīti citu zivju darbību rezultātā. Izvācot mirušos dzīvniekus, ir īpaši jāuzmanās, lai netraumētu vai fiziski nebojātu apkārtējos ikrus vai kāpurus, jo tie ir ārkārtīgi maigi un jutīgi. Nāves kritēriji atšķiras atkarībā no dzīves posma:

— ikriem: it īpaši agrīnajās attīstības stadijās vērojams nozīmīgs gaismas caurlaidības zudums un krāsas maiņa, ko izraisa olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, izraisot baltu necaurspīdīgu izskatu;

▼M6

— kāpuriem un zivju mazuļiem novēro vienu vai vairākas no šādām pazīmēm: nekustīgums un/vai elpošanas kustību trūkums un/vai sirdspukstu trūkums, un/vai centrālās nervu sistēmas necaurspīdīgi balta krāsa, nav reakcijas uz mehāniskiem kairinājumiem.

Izskata anomālijas

39. Ir jāreģistrē kāpuru vai zivju skaits ar anomālu ķermeņa formu, anomālijas izskats un tās raksturs ir jāapraksta. Jāatzīmē, ka arī dabiski ir sastopami anomāli embriji un kāpuri, dažām sugām tie kontrolgrupā(-s) var būt vairāki procenti. Anomālie dzīvnieki jāizņem no testa kamerām tikai nāves gadījumā. Tomēr saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīvu 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību, ja anomālijas izraisa sāpes, ciešanas un diskomfortu vai ilgstošu kaitējumu, un ir droši prognozējama nāve, dzīvnieki ir anestezējami un eitanazējami atbilstoši 44. punktā sniegtajam aprakstam, un datu analīzē apstrādājami kā miruši.

Uzvedības anomālijas

40. Tādas anomālijas kā, piem., hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, netipisks miers un netipiska barošanās uzvedība, ir jānovēro un jāprotokolē.

Svars

41. Testa beigās visas izdzīvojušās zivis tiek eitanazētas (anestezētas, ja vajadzīgi asins paraugi), un ir jānosaka to individuālais mitrais svars (pēc nosusināšanas).

Garums

42. Testa beigās izmēra individuālu dzīvnieku garumu (standarta garums).

43. Šo novērojumu rezultātā tiks iegūti daži vai visi gala ziņojumam nepieciešamie dati:

— kumulatīvā mirstība;

— veselo zivju skaits testa beigās;

— šķilšanās sākuma un beigu laiks;

— izdzīvojušo dzīvnieku garums un svars;

— deformēto kāpuru skaits;

— zivju skaits ar redzamām darbības anomālijām.

Zivju ņemšana paraugiem

44. Zivju ņemšana paraugiem tiek veikta testa beigās. Ievāktās zivis tiek eitanazētas, piem., ar MS-222 (100-500 mg uz l, buferēts ar 200 mg $NaHCO_3$ uz l) vai FA-100 (4-alili-2-metoksilfenols: eigenols), pēc tam individuāli nomērītas, un tiek noteikts to mitrais svars (pēc nosusināšanas) vai arī anestezētas, ja nepieciešami asins paraugi (sk. 49. punktu).

Paraugu ņemšana *VTG* analīzēm un dzimuma noteikšana ar histoloģisko vērtēšanu

45. Visas zivis ir jāņem paraugiem un jāsagatavo dzimuma un *VTG* analīzei. Dzimuma noteikšanai visas zivis histoloģiski analizē. *VTG* noteikšanai var

▼M6

ievākt mazākas paraugu apakšgrupas, no katra replikāta ņemot 16 zivis. Tomēr, ja paraugu grupu *VTG* analīžu rezultāti izrādās neskaidri, ir jāanalizē lielāks zivju skaits.

46. Paraugu ņemšanas procedūra *VTG* analīzēm un dzimuma noteikšanai ir atkarīga no *VTG* analīzes metodes.

Galvas/astes homogenizētā materiāla metode VTG analīzēm

47. Zivi eitanazē. Katrai zivij no ķermeņa atdala galvu un asti, ar skalpeli izdarot griezienu tieši aiz krūšu spuras un tieši aiz muguras spuras (sk. 1. attēlu). Galvas un astes daļas no katras zivs tiek savāktas, nosvērtas un individuāli sanumurētas, sasaldētas šķidrā slāpeklī un uzglabātas *VTG* analīzēm -70 °C vai zemākā temperatūrā. Katras zivs ķermeņa paraugi tiek sanumurēti un fiksēti piemērotā fiksējošā vielā histoloģiskajai pārbaudei (22). Ar šīs metodes palīdzību *VTG* un histopatoloģija tiek veikta katrai zivij atsevišķi, un tādējādi *VTG* līmeņa iespējamās maiņas var tikt saistītas ar zivs fenotipisko dzimumu un ģenētisko dzimumu (Japānas medakai un trīsadatu stagaram). Sīkāku informāciju skatīt homogenizēšanas norādījumos (5. papildinājums) un *VTG* kvantitatīvas noteikšanas norādījumos (6. papildinājums).

Aknu homogenizētā materiāla metode VTG analīzei

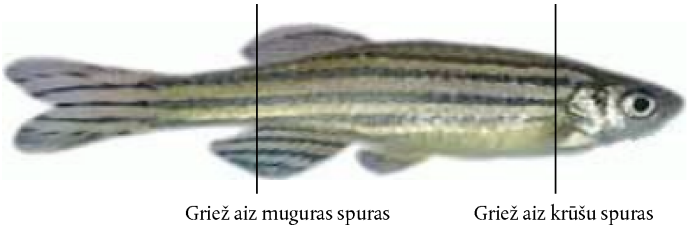
48. Zivi eitanazē. Aknas izpreparē un uzglabā -70 °C vai zemākā temperatūrā. Aknu izņemšanai ieteicamās procedūras un priekšapstrāde aplūkotas ESAO *TG* 229 (37) vai šā pielikuma C.37. nodaļā. Pēc tam aknas individuāli homogenizē saskaņā ar ESAO *TG* 229 vai šā pielikuma C.37. nodaļu. Iegūto centrifugātu lieto *VTG* analīzei ar homologo *ELISA* metodi (sk. 6. papildinājumu zebrzivs materiāla kvantitatīvai noteikšanai vai ESAO *TG* 229 (37) Japānas medakai). Izmantojot šo pieeju, ir iespējams iegūt datus gan par individuālu zivju *VTG*, gan gonādu histoloģiju.

Asins plazmas metode VTG analīzēm

49. Anestezētām zivīm asinis var tikt ņemtas ar šādām metodēm: ar dūrienu sirdī, no astes vēnas vai iegriežot astē; plazmas iegūšanai asinis centrifugē 4 °C temperatūrā. Līdz lietošanai plazmu uzglabā -70 °C vai zemākā temperatūrā. Zivi eitanazē un fiksē histoloģiskajām analīzēm. Gan plazmas paraugi, gan zivis tiek atsevišķi numurētas, lai varētu saistīt *VTG* vērtības ar zivs dzimumu.

1. attēls

Zivs sagriešana galvas/astes homogenizētā materiāla iegūšanai, kas vajadzīgs *VTG* mērījumiem un vidusdaļas histoloģiskam novērtējumam



▼M6

Ģenētiskā dzimumu noteikšana

50. Sugām, kurām ir attiecīgi marķieri, no individuālām zivīm ņem paraugus ģenētiskā dzimuma noteikšanai. Japānas medakai tiek ņemta anālā vai muguras spura. Detalizēts apraksts ir sniegts 9. papildinājumā, tostarp audu ņemšana paraugiem un dzimuma noteikšana ar *PCR* metodi. Par trīsadatu stagara audu paraugu ievākšanu un dzimuma noteikšanu ar *PCR* metodi apraksts sniegts 10. papildinājumā.

***VTG* mērīšana**

51. *VTG* mērījumi ir jābalsta uz kvantitatīvi un analītiski validētu metodi. Jābūt pieejamai informācijai par konkrētajā laboratorijā lietotās metodes mainību viena testa robežās un starp vairākiem testiem. Mainības iemesls viena testa robežās un starp vairākiem testiem (visdrīzāk) ir saistāms ar zivju populācijas dažādām attīstības stadijām. Ņemot vērā *VTG* mērījuma mainību, uz minētā beigupunkta balstītie *NOEC* novērtējumi ir analizējami ar lielu rūpību. Šajā testā ir apskatītas dažādas pieejamās metodes *VTG* veidošanās noteikšanai zivju sugās. Mērījumu metode, kas ir gan relatīvi jutīga, gan specifiska, ir olbaltumvielu koncentrāciju noteikšana ar imūnfermentatīvās analīzes (*ELISA*) palīdzību. Jāizmanto homologās antivielas (izstrādātas pret dažu sugu *VTG*) un būtiski lietot homologos standartus.

Dzimuma noteikšana

52. Histoloģiskajai dzimuma noteikšanai (pēc izvēles arī gonādas stadijas noteikšanai) veselas zivis vai katras zivs atlikušo vidusdaļu (atkarībā no *VTG* paraugu ievākšanas procedūras) novieto iepriekš marķētā kasetē un fiksē ar piemērotu fiksācijas vielu. Fiksācijas un ieguldīšanas norādījumi ir sniegti 7. papildinājumā, kā arī ESAO Norādījumu dokumentā par zivju gonādu endokrīnās histopatoloģijas diagnosticēšanu (22). Pēc apstrādes zivis tiek ieguldītas parafīna blokos. Zivis parafīna blokos liekamas gareniski. No katra īpatņa paņem vismaz sešus frontālas plaknes garengriezumus (3-5 μm biezus), kuros ietilpst gonādu audi. Intervālam starp griezumiem jābūt apmēram 50 μm tēviņiem un 250 μm mātītēm. Tā kā katrā blokā var būt kopā gan mātītes, gan tēviņi (ja katrā blokā ieguldīts vairāk nekā viens indivīds), intervālam starp griezumiem šādos blokos jābūt apmēram 50 μm, kamēr iegūti vismaz seši gonādu griezumi no katra tēviņa. Pēc tam intervālu starp griezumiem mātītēm var palielināt līdz 250 μm. Izgriezumi tiek krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu un aplūkoti gaismas mikroskopā, fokusējoties uz dzimumu (tēviņš, mātīte, starpdzimumu, nediferencēts). Starpdzimumu gadījumu definē kā situāciju, kad uz sešām analizētajām sekcijām ir vairāk nekā viens oocīts sēklinieka vai spermatoģenēzes šūnas (jā/nē) olnīcās. Histopatoloģija un olnīcu un sēklinieku attīstības stadijas noteikšana nav obligāta, bet, ja tā veikta, tad rezultāti ir statistiski jāapstrādā un jāiekļauj testēšanas pārskatā. Jāatzīmē, ka dažām sugām var dabiski nebūt pilnīgi attīstīta gonādu pāra un var būt tikai viena gonāda (piem., Japānas medakai un dažkārt arī zebrzivij). Visi šādi novērojumi ir jāreģistrē.

53. Ģenētiskā dzimuma noteikšana Japānas medakai balstās uz to, vai ir konstatējams medaku vīrišķo dzimumu noteicošais gēns GMY, kas atrodas Y hromosomā. Medaku genotipisko dzimumu var noteikt, sekvencējot DMY gēnu no DNS, kas ekstrahēts, piem., no anālās spuras vai muguras spuras gabala. DMY klātbūtne liecina par XY (tēviņu) neatkarīgi no fenotipa, un

▼M6

DMY trūkums liecina par XX (mātīti) neatkarīgi no fenotipa (23). Norādījumi audu sagatavošanā un *PCR* metodes izmantošanā sniegti 9. papildinājumā. Trīsadatu stagaru indivīdu ģenētiskais dzimums ir nosakāms arī ar *PCR* metodi, kas aprakstīta 10. papildinājumā.

54. Starpdzimumu gadījumi (definīciju sk. 1. papildinājumā) jāiekļauj testēšanas pārskatā.

Sekundārās dzimumpazīmes

55. Sekundārās dzimumpazīmes endokrīnās sistēmas ietekmē veidojas tādām sugām kā Japānas medakai; tādēļ zivju fiziskā izskata novērojumi pēc iespējas veicami ekspozīcijas beigās. Japānas medakai androgēnjutīgs ir papilārs veidojums anālās spuras aizmugurējā daļā. Šā pielikuma C.37. nodaļā (38) atrodamas tēviņu sekundāro dzimumpazīmju raksturojuma un androgenizētu mātīšu fotogrāfijas.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

56. Svarīgi, lai beigupunktu nosaka ar pārliecinošāko derīgo statistisko testu. Eksperimenta vienība ir replikāts, bet atšķirības starp replikātiem ir jāiekļauj statistiskajās analīzēs. Lai palīdzētu izvēlēties piemērotāko statistiskās analīzes metodi atkarībā no testā iegūto datu pazīmēm, 8. papildinājumā ievietota lēmumu pieņemšanas diagramma. Statistiskais nozīmīguma līmenis visiem testā iekļautajiem beigupunktiem ir 0,05.

Dzimuma un ģenētiskā dzimuma attiecība

57. Ja reakcija uz devu ir monotona, dzimumu attiecību analizē ar Džonkhīra-Terpstra testu (trenda testu), lai noteiktu ekspozīcijas būtisku ietekmi (*NOEC/LOEC* pieeja). Ja konstatē nemonotonitāti, jāizmanto pāru testēšana. Ja var panākt normalitāti un homogēnu dispersiju, izmanto Daneta testu. Ja konstatē heterogēnu dispersiju, izmanto Tamheina-Daneta testu. Pretējā gadījumā izmantot eksakto Manna-Vitnija testu ar Bonferoni-Holma korekciju. Diagramma, kas parāda dzimumu attiecības analizēšanas statistiskās metodes, ievietota 8. papildinājumā. Dzimumu proporcijas jānorāda tabulās kā koncentrāciju proporcijas ± SD (standartnovirze) tēviņiem, mātītēm, starpdzimumu un nediferencētiem īpatņiem. Jāuzsver statistiskais būtiskums. Piemēri apskatāmi *FSDT* 2. fāzes validācijas ziņojumā (42). Ģenētisko dzimumu jānorāda kā fenotipiskā dzimuma apvērses procentuālo daļu tēviņiem, mātītēm, starpdzimumu un nediferencētiem indivīdiem.

***VTG* koncentrācijas**

58. *VTG* koncentrācijas jāanalizē, lai noteiktu būtisku ekspozīcijas ietekmi (*NOEC/LOEC* pieeja). Daneta testam ir dodama priekšroka salīdzinājumā ar t-testu ar Bonferoni korekciju. Ja izmanto Bonferoni korekciju, priekšroka dodama Bonferoni-Holma korekcijai. Lai panāktu normalitāti un dispersijas homogenitāti, pieļaujama *VTG log*-transfomācija. Tomēr gadījumā, ja atbildes reakcija uz koncentrāciju un ir monotona, Džonkhīra-Terpstra tests ir ieteicamāks par visiem iepriekš minētajiem. Ja tiek lietots t-tests

▼M6

vai Daneta tests, nav nepieciešams lietot *ANOVA* nozīmīguma F-testu. Papildu informācija pieejama 8. papildinājuma diagrammā. Rezultāti jāapkopo tabulās, norādot tēviņu, mātīšu, starpdzimumu vai nediferencēto indivīdu koncentrāciju vidējos rezultātus ± SD. Jāizceļ statistiskais būtiskums fenotipiskajām mātītēm un fenotipiskajiem tēviņiem. Piemēri apskatāmi *FSDT* 2. fāzes validācijas pārskatā (42).

Testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas

59. Testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas testa kamerās jāanalizē ar 34. punktā aprakstīto biežumu. Rezultāti jānorāda tabulās kā vidējās koncentrācijas ± SD no replikātiem, kā arī no koncentrācijām, norādot paraugu skaitu, kā arī norādot gadījumus, kad konstatētas novirzes par vairāk nekā ± 20 % no apstrādes vidējās koncentrācijas. Piemēri apskatāmi *FSDT* 2. fāzes validācijas ziņojumā (42).

Rezultātu interpretācija

60. Testa rezultāti jāinterpretē ļoti uzmanīgi gadījumos, kad mērītās testējamās ķīmiskās vielas ir tuvu analītiskās metodes detektēšanas robežai.

Testēšanas pārskats

61. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā ķīmiskā viela

— Attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības; ķīmiskās identifikācijas dati, ieskaitot testējamās ķīmiskās vielas tīrību un kvantificēšanas analītisko metodi.

Testa apstākļi

— Izmantotās testēšanas procedūras (piem., caurplūdes sistēmas/daļēji statiskas/sistēmas ar periodisku ūdens nomaiņu); testēšanas plāns, iekļaujot testa koncentrācijas, izejšķīduma sagatavošanas metodi (pielikumā), ūdens nomaiņas biežumu (ja izmantots, jāmin šķīdinātājs un tā koncentrācijas);

— nominālās testa koncentrācijas, vidējās izmērītās vērtības un to standartnovirzes testa kamerās, metode, ar kādu noskaidrotas šīs koncentrācijas (izmantotās analītiskās metodes jānorāda pielikumā); apliecinājums, ka mērījumi attiecas uz testējamās vielas koncentrācijām homogēnā šķīdumā;

— ūdens kvalitāte testa kamerās: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— detalizēta informācija par barošanu (barības veids(-i), avots, barošanas daudzums un biežums), kā arī piesārņojums (piem., *PCB*, *PAH*, organiskie pesticīdi), ja attiecināms.

Rezultāti

— Pierādījumi, ka kontrolgrupas atbilst derīguma kritērijiem: dati par izšķilšanās rādītāju jānorāda tabulās kā procentuālā daļa uz replikātu un uz koncentrāciju. Jāizceļ vērtības ārpus pieņemamības kritēriju robežām (kontrolgrupās). Izdzīvotība ir jānorāda procentuāli uz replikātu un uz koncentrāciju. Jāizceļ vērtības ārpus pieņemamības kritēriju robežām (kontrolgrupās);

— skaidri jānorāda rezultāti, kas iegūti dažādo beigupunktu novērojumos: embriju izdzīvotība un šķilšanās; ārējās anomālijas; garums un svars; *VTG* mērījumi (ng/g homogenāta; ng/g plazmas vai ng/g

▼**M6**

aknu); gonādu histoloģija, dzimumu attiecība, ģenētiskā dzimuma dati; informācija par jebkādu neparastu zivju uzvedību un jebkādas testējamās ķīmiskās vielas izraisītas redzamas izpausmes.

62. Rezultāti ir jāattēlo kā vidējās vērtības ± standartnovirze (*SD*) vai standartkļūda (*SE*). Statistikas dati jāparāda kā minimālās *NOEC* un *LOEC* koncentrācijas un ticamības intervāli. Izmanto statistikas metožu diagrammu (8. papildinājums).

LITERATŪRA

(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) Punkter, 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

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney 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. Punkter, 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) Punkter, 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) Punkter, 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) Šā pielikuma C.14. nodaļa. Zivju mazuļu augšanas tests.

(35) Šā pielikuma C.4. nodaļa. Tūlītēja bionoārdāmība.

(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) Šā pielikuma C.37. nodaļa: 21 dienas zivju tests: īstermiņa skrīningtests estrogēnās un androgēnās aktivitātes un aromatāzes inhibēšanas noteikšanai.

(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) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

▼**M6**

1. papildinājums

Saīsinājumi un definīcijas

Apikālais beigupunkts – rada ietekmi populācijas līmenī

ASV – gaisa piesātinājuma vērtība

Biomarķieris – rada ietekmi individuālā līmenī

Ķīmiska viela – viela vai maisījums

Dph – dienas pēc izšķilšanās

DMY – *Y* specifisks *DM* domēna gēns, kas nepieciešams Japānas medakas tēviņu attīstībai

ELISA – imūnfermentatīvā analīze

Zivs svars – zivs mitrais svars (pēc nosusināšanas)

FSDT – zivju dzimumattīstības tests

***HPG* ass** – hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass

Starpdzimumu zivs – zivs ar vairāk nekā vienu olšūnu sēklinieka sešās analizētajās sekcijās vai spermatoģenēzes šūnu olnīcās (jā/nē)

Noslogojums – zivju mitrais svars uz ūdens tilpuma vienību

MOA – iedarbības veids

RT-PCR – atgriezeniskās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcija

Testējamā ķīmiskā viela – jebkura ķīmiska viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi

Nediferencēta zivs – zivs ar gonādām, kas neuzrāda pamanāmas dzimumšūnas

VTG – vitellogenīns

▼M6

2. papildinājums

Eksperimentālie apstākļi *FSDT* (saldūdens sugām)

1. Ieteicamās sugas	Japānas medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrzivs (*Danio rerio*)	Trīsadatu stagars (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Testa veids	Caurplūdes vai daļēji statiskos apstākļos	Caurplūdes vai daļēji statiskos apstākļos	Caurplūdes vai daļēji statiskos apstākļos
3. Ūdens temperatūra	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Apgaismojuma kvalitāte	Luminiscences spuldzes (plašs spektrs)	Luminiscences spuldzes (plašs spektrs)	Luminiscences spuldzes (plašs spektrs)
5. Gaismas intensitāte	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksi, vai 50–100 ft-c (apkārtējās vides līmeņi laboratorijā)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksi, vai 50–100 ft-c (apkārtējās vides līmeņi laboratorijā)	10–20 μE/m^2/s, 540–1 080 luksi, vai 50–100 ft-c (apkārtējās vides līmeņi laboratorijā)
6. Fotoperiods	12–16 stundas apgaismojumā un 8–12 stundas tumsā	12–16 stundas apgaismojumā un 8–12 stundas tumsā	16 stundas apgaismojumā un 8 stundas tumsā
7. Minimālais kameras izmērs	Individuālajās kamerās jāietilpst vismaz 7 l ūdens tilpuma	Individuālajās kamerās jāietilpst vismaz 7 l ūdens tilpuma	Individuālajās kamerās jāietilpst vismaz 7 l ūdens tilpuma
8. Testēšanas šķīdumu tilpuma nomaiņa	Vismaz piecas reizes dienā	Vismaz piecas reizes dienā	Vismaz piecas reizes dienā
9. Testa organismu vecums ekspozīcijas sākumā	Tikko apaugļoti ikri (agrīnās blastulas posms)	Tikko apaugļoti ikri (agrīnās blastulas posms)	Tikko apaugļoti ikri
10. Ikru skaits vienā apstrādes variantā	Vismaz 120	Vismaz 120	Vismaz 120
11. Apstrādes variantu skaits	Vismaz 3 (un attiecīgs kontrolgrupu skaits)	Vismaz 3 (un attiecīgs kontrolgrupu skaits)	Vismaz 3 (un attiecīgs kontrolgrupu skaits)
12. Replikātu skaits vienam apstrādes variantam	Vismaz 4 (ja vien kontrolgrupas datu analīzē neizmanto kvadrātsakni)	Vismaz 4 (ja vien kontrolgrupas datu analīzē neizmanto kvadrātsakni)	Vismaz 4 (ja vien kontrolgrupas datu analīzē neizmanto kvadrātsakni)
13. Barošanas režīms	Dzīvas *Artemia*, saldētas pieaugušas sālsūdens garneles, pārslu barība utt. Ieteicams barot divreiz dienā	Īpaša zivju mazuļu barība, dzīvas *Artemia*, saldētas pieaugušas sālsūdens garneles, pārslu barība utt. Ieteicams barot divreiz dienā	Dzīvas *Artemia*, saldētas pieaugušas sālsūdens garneles, pārslu barība utt. Ieteicams barot divreiz dienā
14. Piesātināšana ar gaisu	Neveic, ja vien *DO* koncentrācija nesamazinās zemāk par 60 % piesātinājuma	Neveic, ja vien *DO* koncentrācija nesamazinās zemāk par 60 % piesātinājuma	Neveic, ja vien *DO* koncentrācija nesamazinās zemāk par 70 % piesātinājuma

▼**M6**

15. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, avota vai attīrīts ūdens	Tīrs virszemes, avota vai attīrīts ūdens	Tīrs virszemes, avota vai attīrīts ūdens
16. Ekspozīcijas testējamajai ķīmiskajai vielai ilgums	60 *dph*	60 *dph*	60 *dph*
17. Bioloģiskie beigupunkti	Izšķilšanās sekmes, izdzīvotība, vispārējā morfoloģija, *VTG*, gonādu histoloģija, ģenētiskais dzimums, dzimumu attiecība	Izšķilšanās sekmes, izdzīvotība, vispārējā morfoloģija, *VTG*, gonādu histoloģija, dzimumu attiecība	Izšķilšanās sekmes, izdzīvotība, vispārējā morfoloģija, *VTG*, gonādu histoloģija, dzimumu attiecība
18. Testa pieņemamības kritēriji izvēlētajām kontrolgrupām	Izšķilšanās sekmes > 80 %	Izšķilšanās sekmes > 80 %	Izšķilšanās sekmes > 80 %
	Izdzīvotība pēc izšķilšanās ≥ 70 %	Izdzīvotība pēc izšķilšanās ≥ 70 %	Izdzīvotība pēc izšķilšanās ≥ 70 %
	Augšana (zivs mitrais svars pēc nosusināšanas) > 150 mg	Augšana (zivs mitrais svars pēc nosusināšanas) > 75 mg	Augšana (zivs mitrais svars pēc nosusināšanas) > 120 mg
	Garums (standarta garums) > 20 mm	Garums (standarta garums) > 14 mm	Garums (standarta garums) > 20 mm
	Dzimumu attiecība (% tēviņu vai mātīšu) 30 %–70 %	Dzimumu attiecība (% tēviņu vai mātīšu) 30 %–70 %	Dzimumu attiecība (% tēviņu vai mātīšu) 30 %–70 %

▼**M6**

3. papildinājums

Piemērota atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie rāksturlielumi

SASTĀVDAĻA	KONCENTRĀCIJA
Cietās daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Hlora atlikumi	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenīlu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

▼**M6**

4. papildinājums

No C.14. testēšanas metodes/Norādījumi par testa koncentrācijām

Aile (koncentrāciju skaits starp 100 un 10 vai starp 10 un 1) (*)						
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

(*) No ailes var izvēlēties trīs (vai vairāku) secīgu koncentrāciju rindu. Viduspunkti starp koncentrācijām ailē x ir atrodami ailē 2x + 1. Uzskaitītie lielumi var pārstāvēt koncentrācijas, kas izteiktas tilpuma vai svara procentos (mg/l vai µg/l). Lielumus attiecīgā gadījumā var reizināt vai dalīt ar jebkuru skaitļa 10. pakāpi. 1. aili var izmantot, ja ir ievērojama nenoteiktība par toksicitātes līmeni.

▼M6

5. papildinājums

Norādījumi zebrzivs, biezpaura grunduļa, trīsadatu stagara un Japānas medakas mazuļu galvu un astu homogenizēšanai

Šīs nodaļas mērķis ir raksturot procedūras, kas jāveic pirms *VTG* koncentrācijas izteikšanas kvantitatīvos lielumos. Var lietot arī citas procedūras, kas ļauj iegūt salīdzināmus *VTG* kvantitatīvos lielumus. Pēc izvēles *VTG* koncentrāciju var noteikt arī asins plazmā vai aknās, ne tikai galvu/astu homogenātā.

Procedūra

1. Zivīm veic anestēziju un eitanāziju saskaņā ar testa aprakstu.

2. Zivīm nogriež galvas un astes saskaņā ar testa aprakstu. **Svarīga piezīme:** visus sadalīšanas instrumentus un griežamo dēli rūpīgi noskalo un notīra (piem., ar 96 % etanolu) pēc katras atsevišķās zivs apstrādes, lai novērstu kontrolgrupas tēviņu "*VTG* piesārņojumu" no mātītēm vai apstrādātiem tēviņiem.

3. Katras zivs galvas un astes kopsvaru mēra ar precizitāti līdz tuvākajam mg.

4. Pēc nosvēršanas šīs daļas ievieto piemērotās mēģenēs (piem., 1,5 ml Eppendorfa mēģenēs) un sasaldē – 80 °C temperatūrā līdz viendabīgas masas iegūšanai vai tiešā veidā homogenizē uz ledus ar divām plastmasas piestulām. (Var lietot arī citas metodes, ja to dara uz ledus un rezultātā iegūst viendabīgu masu.) **Svarīga piezīme:** *mēģenes pienācīgi numurē tā, lai zivs galvu un asti varētu identificēt ar attiecīgo ķermeņa daļu, ko izmanto gonādu histoloģijai.*

5. Pēc viendabīgas masas iegūšanas pievieno ledusaukstu **homogenizācijas buferšķīdumu** (*) apjomā, kas 4–10 reizes pārsniedz audu svaru (atzīmē atšķaidījuma pakāpi). Turpina darbu ar piestulām, kamēr maisījums kļūst viendabīgs. **Svarīga piezīme:** *katrai zivij izmanto jaunas piestulas.*

6. Paraugus novieto uz ledus, tad 30 minūtes griež centrifūgā **4 °C** temperatūrā ar 50 000 g.

7. Ar pipeti sadala centrifugātu no 20 līdz 50 µl lielās porcijās (atzīmē apjomu) **vismaz divās** mēģenēs, iemērcot pipetes atvērto galu zem tauku slāņa uz virsmas un rūpīgi izsūcot centrifugātu bez taukiem vai sabiezējumiem.

8. Pirms lietošanas mēģenes uzglabā – 80 °C temperatūrā.

(*) *Homogenizācijas buferšķīdums:*

50 mM tris-HCl pH 7,4; 1 % proteāzes inhibitora kokteilis *(Sigma)* – 12 ml tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteāzes inhibitora kokteiļa (vai proteāzes inhibitora kokteiļu ekvivalenta).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteāzes inhibitora kokteilis: no *Sigma* (zīdītāju audiem), produkta numurs **P 8340**.

Piezīme. Homogenizācijas buferšķīdumu izlieto tā pagatavošanas dienā. Lietošanas laikā novieto uz ledus.

▼M6

6. papildinājums

Norādījumi zebrzivs *(Danio rerio)* galvu un astu homogenāta vitellogenīna kvantificēšanai (grozījumi pēc *Holbech et al.*, 2001). var izmantot citas procedūras, kurās lieto homologas antivielas un standartvielas

1. Mikrotitru plates (sertificētā *Maxisorp F96, Nunc*, Roskilde, Dānija), kas iepriekš pārklātas ar 5 µg/ml anti-zebrzivs lipovitellīnu-IgG, atkausē un mazgā trīs reizes ar mazgāšanas buferšķīdumu (*).

2. Attīrītu zebrzivs vitellogenīna standartvielu ([1]) sērijveidā atšķaida līdz 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 un 20 ng/ml atšķaidīšanas buferšķīdumā (**), un paraugus atšķaida vismaz 200 reizes (lai novērstu matricas efektu) atšķaidīšanas buferšķīdumā un uzklāj uz platēm. Testa kontroli veic divreiz. Katram avotam izmanto 150 µl. Standartvielas izmanto divreiz, un paraugus – trīsreiz. Inkubē kratītājā pa nakti 4 °C temperatūrā.

3. Plates nomazgā piecas reizes ar mazgāšanas buferšķīdumu (*).

4. *HRP*, kas savienots ar dekstrāna ķēdi (piem., *AMDEX A/S*, Dānija), un saistītās antivielas atšķaida mazgāšanas buferšķīdumā; faktiskā atšķaidīšanas pakāpe katrai partijai un vecumam ir cita. 150 µl izmanto katram avotam, un plates inkubē kratītājā vienu stundu istabas temperatūrā.

5. Plates mazgā piecas reizes ar mazgāšanas buferšķīdumui (*), bet apakšpuses tām rūpīgi notīra ar etanolu.

6. Katrā iedobumā lieto 150 µl *TMB plus* (***). Plates aizsargā pret gaismu ar alvas foliju, un novēro krāsu izmaiņas kratītājā.

7. Kad standarta līkne ir pilnībā izveidota, enzīmu aktivitāti aptur, katrā avotā pievienojot 150 µl 0,2 M H_2SO_4.

8. Absorbciju mēra pie 450 nm (piem., izmantojot *Molecular Devices Thermomax* plates nolasītāju). Datus analizē ar saistītu programmatūru (piem., *Softmax*).

(*) Mazgāšanas buferšķīdums

PBS bāze (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Maina pH uz 7,3 un papildina līdz 5 l ar miliporu H_2O. Uzglabā 4 °C temperatūrā.

(**) Atšķaidīšanas buferšķīdums

PBS bāze (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Maina pH uz 7,3 un papildina līdz 1 l ar miliporu H_2O. Uzglabā 4 °C temperatūrā.

(***) *TMB plus* ir lietošanai gatavs substrāts, ko ražo *KemEnTec* (Dānija). Tas ir gaismjutīgs. Uzglabā 4 °C temperatūrā.

([1]) *Battelle AP4.6.04* (1,18 mg/ml (AAA)), kas attīrīts saskaņā ar: *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* izejšķīdums

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Maina pH uz 6,8 un papildina ar milliporu H_2O līdz 2 l. Uzglabā istabas temperatūrā.

▼M6

7. papildinājums

Norādījumi audu sekciju sagatavošanai dzimuma noteikšanai un gonādu attīstības stadiju klasificēšanai

Šā papildinājuma mērķis ir raksturot procedūras, kas jāveic pirms histoloģisko sekciju novērtēšanas. Var izmantot citas procedūras, kas līdzīgā veidā ļauj noteikt dzimumu un klasificēt gonādu attīstības stadijas.

Ar nedaudziem izņēmumiem Japānas medakām (JMD) un zebrzivīm (ZZ) šīs procedūras ir līdzīgas.

Eitanāzija, autopsija un audu fiksācija

Mērķi

1. Nodrošināt humānu zivs nonāvēšanu.

2. Iegūt nepieciešamo ķermeņa svaru un mērījumus.

3. Novērtēt sekundārās dzimumpazīmes.

4. Iegūt audus *VTG* analīzei.

5. Fiksēt gonādas.

Procedūras

1. Zivs jānonāvē tieši pirms autopsijas. Tādēļ, ja vien nedarbojas vairāki anatomi, vairākas zivis nedrīkst nonāvēt vienlaikus.

2. Ar smalku tīkliņu zivi izceļ no eksperimentālās kameras un pārnēsājamā traukā nogādā autopsijas zonā.

3. Zivi ievieto eitanāzijas šķīdumā. Zivi izceļ no šā šķīduma, kad tā pārtrauc elpot un nereaģē uz ārējiem kairinājumiem.

4. Nosaka zivs parauga kopējo svaru.

5. Lai sagatavotu audus *VTG* analīzei, zivi var novietot uz korķa plāksnītes uz anatomiskā mikroskopa platformas.

   a. Zebrzivij galvu nogriež tieši aiz krūšu spuras un asti nogriež tieši aiz muguras spuras.

   b. Japānas medakai vēderu atver, rūpīgi veicot iegriezumu gar vēdera viduslīniju aiz galvaskausa uz punktu pašā anālās atveres galā. Ar nelielu pinceti un mazām šķērītēm rūpīgi atdala aknas.

6. *VTG* analīzes paraugus ievieto Ependorfa mēģenēs un nekavējoties sasaldē šķidrā slāpeklī.

7. Liemeni, tostarp gonādas, novieto iepriekš marķētā audiem paredzētā plastmasas kasetē, ko ievieto Davidsona vai Buina fiksācijas šķīdumā. Fiksācijas šķīduma tilpumam vismaz desmitkārtīgi jāpārsniedz aptuvenais audu tilpums. Fiksācijas šķīduma trauku viegli krata piecas sekundes, lai likvidētu gaisa burbuļus audu kasetē.

8. a. Visus audus pa nakti atstāj Davidsona fiksācijas šķīdumā, bet nākamajā dienā tos pārvieto uz atsevišķiem traukiem ar 10 % neitrāli buferētu formalīnu. Traukus ar audu kastītēm viegli krata piecas sekundes, lai nodrošinātu tajās pietiekamu formalīna iespiešanos.

▼M6

b. Audus atstāj Buina fiksācijas šķīdumā uz 24 h, tad ievieto 70 % etanolā.

Audu apstrāde

Mērķi

1. Dehidrēt audus, lai tajos pietiekami iespiestos parafīns.

2. Impregnēt audus ar parafīnu, lai saglabātu audu integritāti un radītu cietu virsmu mikrotomijai.

Procedūras

3. Marķētās audu kasetes izņem no formalīna/etanola glabātuves un ievieto apstrādes grozā(-os). Apstrādes grozu ievieto audu procesorā.

4. Izvēlas apstrādes laika grafiku.

5. Kad audu procesors ir pabeidzis apstrādes ciklu, grozu(-us) var pārvietot uz ieguldīšanas staciju.

Ieguldīšana

Mērķis

Pareizi novietot paraugu sacietējušā parafīnā mikrotomijas nolūkiem.

Procedūras

1. Grozu(-s) ar kasetēm izņem no procesora un iemērc ar parafīnu pildītā ieguldīšanas stacijas termiskās konsoles priekškamerā, vai arī šīs kasetes ievieto atsevišķā parafīna sildītājā.

2. Pirmo ieguldāmo kaseti izņem no termiskās konsoles priekškameras vai parafīna sildītāja. Kasetes vāku noņem un izmet, un kasetes marķējumu salīdzina ar dzīvnieka reģistrācijas ierakstu, lai vēl pirms ieguldīšanas novērstu iespējamās nesakritības.

3. Izvēlas atbilstoša lieluma ieguldīšanas veidni.

4. Šo veidni tur zem uzpildes konsoles snīpja un piepilda ar izkausētu parafīnu.

5. Paraugu izņem no kastītes un ievieto izkausētajā parafīnā veidnē. To atkārto ar 4–8 paraugiem katrā parafīna veidnē. Katras atsevišķās zivs stāvokli atzīmē, novietojot to 180 grādu leņķī pret katru 2–4/8. zivi.

6. Pievieno vēl parafīnu, lai apsegtu paraugus.

7. Veidni ar kastīšu pamatni novieto uz krio konsoles dzesēšanas plates.

8. Pēc parafīna sacietēšanas visu bloku (t. i., sacietējušo parafīnu ar audiem un kasetes pamatni) izņem no veidnes.

Mikrotomija

Mērķis

Izgriezt un novietot histoloģiskās sekcijas iekrāsošanai.

Procedūras

1. Turpmāk izklāstīts, kā noris mikrotomijas sākumposms, ko dēvē par "pavēršanu".

   a. Parafīna bloku nostiprina mikrotoma spīļpatronā.

   b. Spīļpatronu groza, pagriežot mikrotoma ratu, un no parafīna bloka virsmas griež nost plānas plēksnes, kamēr nazis sasniedz ieguldītos audus.

▼M6

c. Sekcijas biezumu mikrotomā iestata no 3 līdz 5 mikroniem. Spīļpatronu groza un no bloka nogriež vairākas plēksnes, lai noņemtu jebkurus veidojumus, kas rodas uz audu griezuma virsmas raupjās apgriešanas laikā.

d. Bloku var izņemt no spīļpatronas un apvērstu novietot uz ledus, lai audi samirktu.

2. Nākamais mikrotomijas posms ir audu slāņu galīgā secēšana un novietošana uz priekšmetstikliņiem. Turpmāk izklāstīta šo procedūru norise.

a. Ja bloks ir bijis novietots uz ledus, to noņem no ledus un atkal ievieto mikrotoma spīļpatronā.

b. Sekcijas biezumu mikrotomā iestata no 3 līdz 5 mikroniem, un tad spīļpatronu groza, pagriežot mikrotoma ratu. No bloka griež nost plēksnes, kamēr iegūst "sloksni" ar vismaz vienu pieņemamu slāni, kas satur gonādas. (Secēšanas laikā, ja nepieciešams, bloku var izņemt no spīļpatronas, novietot uz ledus, lai audi samirktu, un ievietot atpakaļ spīļpatronā.)

c. Iegūtās sekcijas plakaniski peldina ūdens vanniņā uz ūdens virsmas. Mēģina iegūt vismaz vienu sekciju bez krunkām un bez gaisa burbuļiem apakšpusē.

d. Mikroskopa priekšmetstikliņu iemērc zem labākās sekcijas, kuru izceļ no ūdens ar priekšmetstikliņu. Minēto procesu dēvē par sekcijas "novietošanu" uz priekšmetstikliņa.

e. Katras zivs komplektam sagatavo trīs šādas sekcijas. Otro un trešo sekciju griež ar 50 mikronu intervālu no pirmās sekcijas. Ja zivs ar gonādām nav ieguldīta vienā un tajā pašā secēšanas līmenī, sagatavo vairākas sekcijas, lai nodrošinātu, ka no katras zivs tiek iegūtas vismaz sešas sekcijas ar gonādām.

f. Ar marķēšanas pildspalvu uz katra priekšmetstikliņa uzraksta tā bloka numuru, kuram tika sagatavots attiecīgais priekšmetstikliņš.

g. Priekšmetstikliņu ievieto iekrāsošanas statīvā.

h. Bloku izņem no spīļpatronas un apvērstu novieto uzglabāšanai.

Iekrāsošana, segstikla uzlikšana un priekšmetstikliņa marķēšana

Mērķi

— Iekrāsot sekcijas histopatoloģiskai izmeklēšanai.

— Pastāvīgi noplombēt novietotos un iekrāsotos audus.

— Pastāvīgi identificēt iekrāsotās sekcijas, lai tās varētu pilnībā izsekot.

Procedūras

1. Iekrāsošana

a. Pirms iekrāsošanas priekšmetstikliņus pa nakti izžāvē gaisā.

b. Sekcijas iekrāso ar hematoksilīnu-eozīnu.

2. Segstikla uzlikšana

a. Segstiklus var uzlikt manuāli vai automātiski.

b. Priekšmetstikliņu iemērc ksilēnā vai *TissueClear*, un lieko ksilēnu/*TissueClear* rūpīgi noņem no priekšmetstikliņa.

▼**M6**

c. Aptuveni 0,1 ml stiprinājuma vielas uzziež netālu no priekšmetstikliņa gala, kas nav matētais gals, vai uz segstikla.

d. Segstiklu, uzklājot priekšmetstikliņam, novieto ieslīpi, šaurā leņķī.

3. Marķēšana

a. Katrā priekšmetstikliņa marķējumā iekļauj turpmāk minēto informāciju.

i. Laboratorijas nosaukums

ii. Suga

iii. Parauga Nr./priekšmetstikliņa Nr.

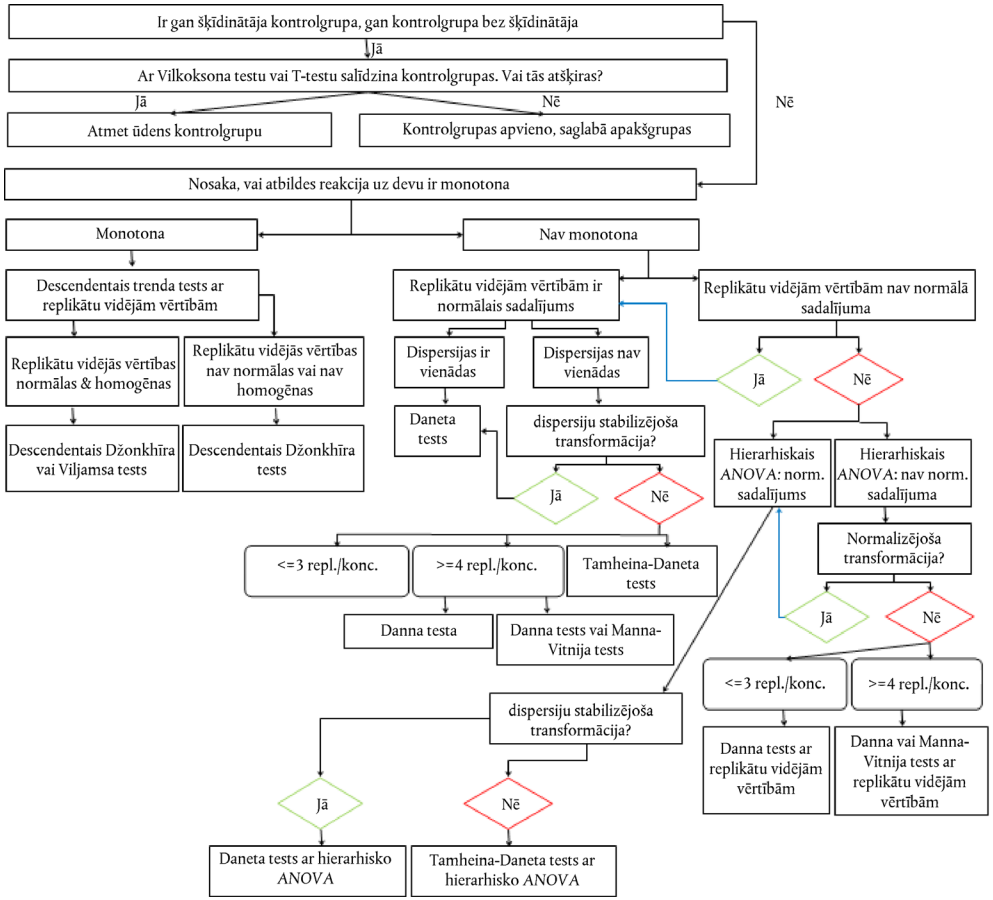
iv. Ķīmiskā viela/apstrādes grupa

v. Datums

▼M6

8. papildinājums

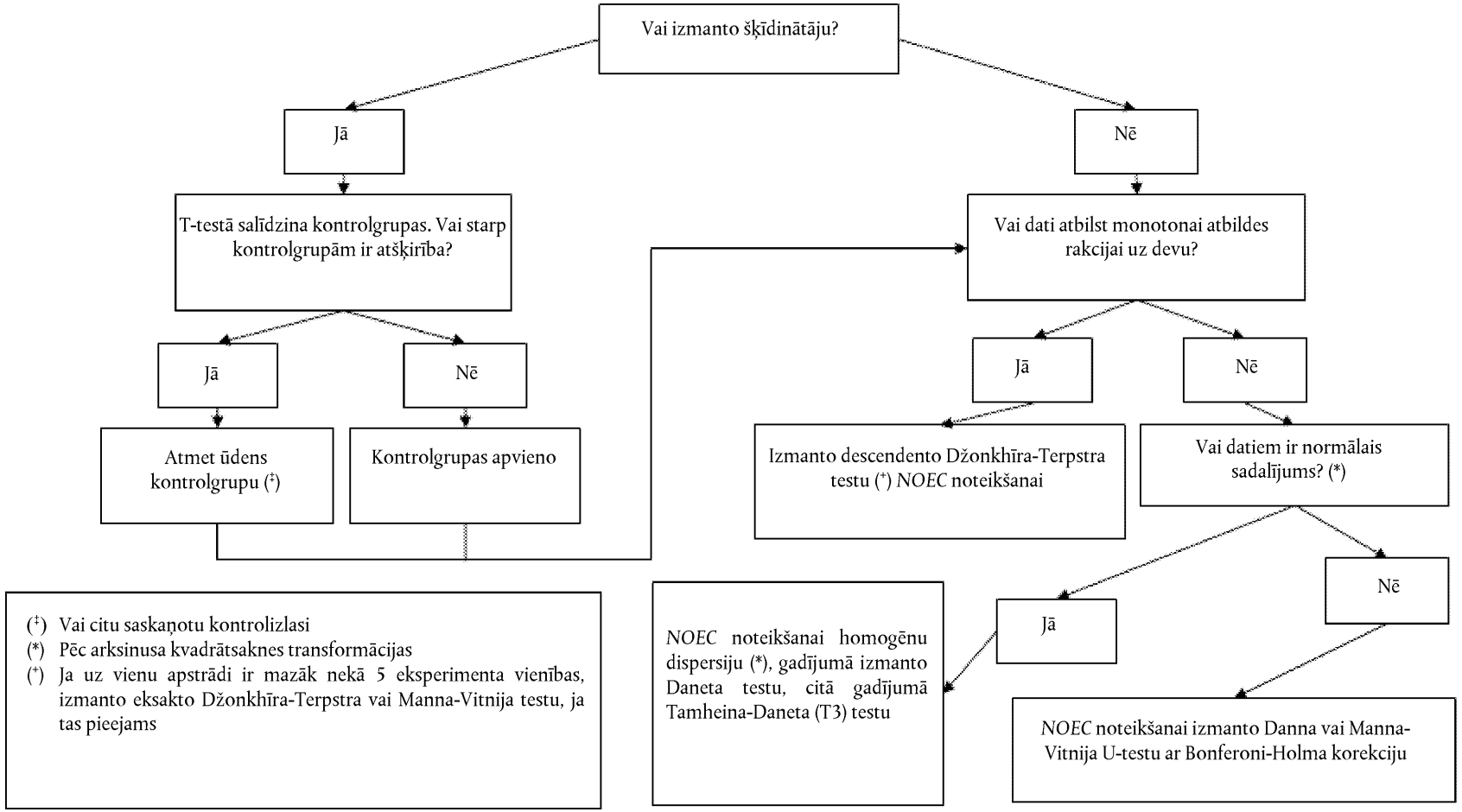
Statistikas diagramma vitellogenīna analīzei



02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Statistikas diagramma dzimumu attiecības analīzei



▼M6

9. papildinājums

Norādījumi audu paraugu ņemšanai, lai noteiktu ģenētisko dzimumu un lai noteiktu ģenētisko dzimumu ar *PCR* metodi

Japānas medakas audu paraugu ņemšana, sagatavošana un uzglabāšana pirms ģenētiskā dzimuma noteikšanas ar *PCR* metodi (sagatavojusi *Bayer CropScience AG* Ūdens organismu laboratorija)

1. Ar mazām šķērītēm katrai atsevišķajai zivij nogriež anālo vai muguras spuru un ievieto to mēģenē, kas piepildīta ar 100 µl 1. ekstrakcijas buferšķīduma (turpmāk ir sniegta informācija par šā buferšķīduma sagatavošanu). Šķēres notīra pēc katras zivs, ievietojot tās vārglāzē, kas piepildīta ar destilētu H_2O, un nosusina ar papīra salveti.

2. Pēc tam spuras audus homogenizē ar teflona piestulu mikromēģenē, lai lizētu šūnas. Katrai mēģenei izmanto jaunu piestulu, lai nepieļautu nekādu piesārņošanos. Piestulas pa nakti ievieto 0,5 M NaOH, skalo piecas minūtes destilētā H_2O un uzglabā etanolā vai pēc tam sterilizē autoklāvā līdz lietošanai.

3. Spuru audus var uzglabāt arī bez 1. ekstrakcijas buferšķīduma uz sausā ledus un pēc tam ledusskapī – 80 °C temperatūrā, lai novērstu jebkādu DNS deģenerāciju. Taču ekstrakcija notiek precīzāk, ja vienlaikus ekstrahējat arī DNS (šī darbība ir aprakstīta iepriekš; paraugus atkausē uz ledus pēc uzglabāšanas – 80 °C temperatūrā, pirms buferšķīduma iepildīšanas mēģenēs).

4. Pēc homogenizācijas visas mēģenes ievieto ūdens vanniņā un vāra 15 minūtes 100 °C temperatūrā.

5. Pēc tam katrā mēģenē ar pipeti iepilda 100 µl 2. ekstrakcijas buferšķīduma (turpmāk sniegta informācija par šā buferšķīduma pagatavošanu). Paraugus uzglabā istabas temperatūrā 15 minūtes un šajā laikā ik pa brīdim viegli sakrata ar roku.

6. Pēc tam visas mēģenes vēlreiz ievieto ūdens vanniņā un vāra vēl 15 minūtes 100 °C temperatūrā.

7. Līdz turpmākajām analīzēm mēģenes sasaldē – 20 °C temperatūrā.

Buferšķīduma sagatavošana

PCR 1. buferšķīdums:

500 mg N-lauroilsarkozīna (piem., *Merck KGaA*, Darmštate, Vācija);

2 ml 5M NaCl;

pievieno 100 ml destilēta H_2O;

→ liek autoklāvā.

PCR 2. buferšķīdums:

20 g *Chelex* (piem., *Biorad*, Minhene, Vācija);

uzbriedina 100 ml destilēta H_2O;

→ liek autoklāvā.

Ģenētiskā dzimuma noteikšana (ar *PCR* metodi) medakām (sagatavojusi *Bayer CropScience AG* Ūdens organismu laboratorija un *Universität Würzburg Biozentrum*)

Sagatavotās un sasaldētās mēģenes (iepriekš aprakstītās) atkausē uz ledus. Pēc tam tās griež centrifūgā, lietojot Ependorfa centrifūgu (30 sekundes ar maks. ātrumu, istabas temperatūrā). *PCR* gadījumā lieto centrifugātu, kas atdalīts no nogulsnēm. Noteikti nedrīkst pieļaut nekādu (nogulsnēs lokalizētu) *Chelex* palieku pārnesi uz *PCR* reakciju, jo tās traucēs *Taq* polimerāzes darbībai. Centrifugātu var lietot tiešā veidā vai uzglabāt turpmākām analīzēm sasaldētā stāvoklī (–20 °C temperatūrā) un atkal atkausēt vairākos ciklos, negatīvi neietekmējot DNS.

▼**M6**

1. "Reakcijas maisījuma" pagatavošana (25 µl katram paraugam)

	Tilpums	Galīgā koncentrācija
Veidnes DNS	0,5 µl – 2 µl	
10 × *PCR* buferšķīdums ar mgCl2	2,5 µl	1 ×
Nukleotīdi (katrs no dATP, dCTP, dGTP un dTTP)	4 µl (5 mm)	200 µM
Augšupejošais praimers (10µ M) (sk. turpmāk 3–5)	0,5 µl	200 nM
Apgrieztais praimers (10µ M) (sk. turpmāk 3–5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Ūdens (*PCR* kategorija)	līdz 25 µl	
Taq e-polimerāze	0,3 µl	1,5 U
10 × *PCR* buferšķīdums ar $mgCl_2$ – 670 mm tris/HCl (pH 8,8 25 °C temperatūrā), 160 mm $(NH_4)_2SO_4$, 25 mm $mgCl_2$, 0,1 % *Tween 20*.		

Katrai *PCR* (sk. turpmāk 3–5) nepieciešams īpašs praimers kā "reakcijas maisījuma" jauna kombinācija un katram paraugam nepieciešamās veidnes DNS pietiekams daudzums (sk. iepriekš). Attiecīgos tilpumus pārvieto jaunās mēģenēs ar pipetēm. Pēc tam visas mēģenes noslēdz, samaisa (aptuveni 10 sekundes) un centrifugē (10 sekundes istabas temperatūrā). Tad var uzsākt attiecīgās *PCR* programmas. Turklāt katrā *PCR* programmā veic pozitīvo kontroli (tipiskam DNS paraugam ar zināmu darbību un nepārprotamiem rezultātiem) un negatīvo kontroli (1 µl destilēta H_2O).

2. (1 %) agarozes gela pagatavošana uzsākto PCR programmu ietvaros

— Izšķīdina 3 g agarozes 300 ml 1 × *TAE* buferšķīduma (1 % agarozes gels)

— Šo šķīdumu vāra, izmantojot mikroviļņus (aptuveni 2–3 minūtes)

— Karsto šķīdumu ielej īpašā lējuma traukā, kas novietots uz ledus

— Aptuveni pēc 20 minūtēm agarozes gels ir gatavs lietošanai

— Agarozes gelu uzglabā 1 × *TAE* buferšķīdumā līdz *PCR* programmu pabeigšanai

3. Aktīna PCR programma

Šīs *PCR* reakcijas mērķis ir pierādīt, ka paraugā DNS nav bojāta.

— Īpašais praimers

"*Mact1* (augšējais/augšupejošais)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

"*Mact2* (apakšējais/apgrieztais)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programma

5 min. 95 °C temperatūrā

Cikls (35 reizes):

denaturēšana → 45 sek. 95 °C temperatūrā;

rūdīšana → 45 sek. 56 °C temperatūrā;

pagarināšana → 1 min. 68 °C temperatūrā.

15 min. 68 °C temperatūrā

▼M6

4. X un Y gēna PCR programma

Paraugi ar neskartajām DNS šajā *PCR* programmā tiks izmantoti X un Y gēnu detektēšanai. Vīrišķajām DNS ir jāuzrāda viena dubulta josla, bet sievišķajām DNS – viena atsevišķa josla (pēc iekrāsošanas un gela elektroforēzes). Šīs programmas īstenošanai ir jāparedz viena pozitīva kontrole tēviņiem (XY paraugam) un viena mātītēm (XX paraugam).

— Īpašais praimers

"PG 17.5" (augšējais/augšupejošais) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

"PG 17.6" (apakšējais/apgrieztais) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programma

5 min. 95 °C temperatūrā

Cikls (40 reizes):

denaturēšana	→ 45 sek. 95 °C temperatūrā;
rūdīšana	→ 45 sek. 55 °C temperatūrā;
pagarināšana	→ 1 min. 30. sek. 68 °C temperatūrā.

15 min. 68 °C temperatūrā

5. Y gēna PCR programma kā "kontrolgrupa" X un Y gēna PCR programmai

Šī *PCR* programma pārbauda "X un Y gēna PCR programmas" rezultātus. "Vīrišķajiem paraugiem" jāuzrāda viena josla, bet "sievišķajiem paraugiem" nav jāuzrāda neviena josla (pēc iekrāsošanas un gela elektroforēzes).

— Īpašais praimers

"DMTYa (augšējais/augšupejošais)" → GGC CGG GTC CCC GGG TG

"DMTYd (apakšējais/apgrieztais)" → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programma

5 min. 95 °C temperatūrā

Cikls (40 reizes):

denaturēšana	→ 45 sek. 95 °C temperatūrā;
rūdīšana	→ 45 sek. 56 °C temperatūrā;
pagarināšana	→ 1 min. 68 °C temperatūrā.

15 min. 68 °C temperatūrā

6. PCR paraugu iekrāsošana

Iekrāsojošais šķīdums:

50 % glicerīns;

100 mm *EDTA*;

1 % *SDS*;

0,25 % bromfenolzilais;

0,25 % ksilēnsianols.

Ar pipeti iepilina 1 µl iekrāsojošā šķīduma katrā atsevišķajā mēģenē.

7. Gela elektroforēzes sākšana

— Sagatavoto 1 % agarozes gelu ievieto gela elektroforēzes kamerā, kas pildīta ar 1 × *TAE* buferšķīdumu.

— 10–15 µl katra iekrāsotā *PCR* parauga ar pipeti iepilina agarozes gela atsevišķā joslā.

— Atsevišķā joslā ar pipeti iepilina arī 5–15 µl 1kb "kāpņu" (invitrogēna).

— Elektroforēzi sāk ar 200 V.

— Beidz pēc 30–45 minūtēm.

▼**M6**

8. Joslu noteikšana

— Agarozes gelu tīra destilētā H_2O.

— Pēc tam agarozes gelu pārvieto etīdija bromīdā uz 15–30 minūtēm.

— Tad ultravioletās gaismas kastē uzņem agarozes gela attēlu.

— Visbeidzot, paraugus analizē, salīdzinot tos ar pozitīvu kontroles joslu (vai joslām) un kāpnēm.

▼M6

10. papildinājums

Norādījumi audu paraugu ņemšanai, lai ar *PCR* metodi noteiktu ģenētisko dzimumu trīsadatu stagaram

Audu paraugu ņemšana un DNS ekstrakcija

DNS var ekstrahēt, lietojot dažādus tirdzniecībā pieejamus reaģentus un gan manuālā, gan automātiskā ekstrakcijas sistēmā. Turpmāk raksturots protokols, ko izmanto *Cefas Weymouth* laboratorija, un attiecīgā gadījumā ir norādītas arī citas metodes.

1. Ar mazām šķērītēm katrai atsevišķajai zivij nogriež nelielu audu gabaliņu (10–20 mg) muguras sānu rajonā (pēc galvas un astes nogriešanas *VTG* analīzei). Šos audus ieliek mēģenē un tieši ievieto šķidrā slāpeklī (uzglabāšanai – 80 °C temperatūrā), vai piepilda ar 70 % etanolu (pārvadāšanai un turpmākai uzglabāšanai 4 °C temperatūrā). Šķēres pēc katras atsevišķās zivs apstrādes notīra 70 % etanolā, tad destilētā ūdenī un nosusina ar papīra salveti.

2. Etanolu (ja ir) noņem ar atsūkšanas metodi, bet audus pa nakti sašķeļ ar proteināzi K, ievietojot tos 400 µl *ATL* buferšķīduma (kiagēna). Šķelšanas produkta alikvotu (200 µl) pārvieto uz 96 avotu S bloku (kiagēnu), un DNS ekstrahē 96 avotu formātā, izmantojot *Qiagen Universal BioRobot* un *QIamp Investigator BioRobot* komplektu. DNS eluē 50 µl ūdens, kas brīvs no DNāzes un RNāzes. Ja DNS ekstrakcijai izmanto cietos audus (piem., muguras vai krūšu spuras), paraugu var būt nepieciešams homogenizēt līzes buferšķīdumā, lietojot *FastPrep*® audu līzeri vai citu līdzvērtīgu audu sagraušanas sistēmu.

   Citas iespējas

   a) Audus pa nakti sašķeļ ar proteināzi K, ievietojot tos 400 µl G2 līzes buferšķīduma (kiagēna), un DNS ekstrahē no 200 µl šķelšanas produkta, izmantojot EZ-1 DNS vieglo audu komplektu un EZ-1 biorobotu vai DNS vieglo audu minikomplektu. DNS eluē 50 µl tilpumā.

   b) Audus apstrādā ar DNSzola reaģentu. Īsumā, audu paraugus līzē 1 ml DNSzola 10 minūtes 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenē un tad centrifugē ar 13 000 apgriezienu minūtē piecas minūtes, lai atdalītu jebkuras cietās daļiņas. Līzēto paraugu pēc tam pārvieto jaunā 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenē, kurā atrodas 500 µl 100 % molekulārās kategorijas etanola, un tad centrifugē ar 13 000 apgriezienu minūtē 10 minūtes, lai DNS izkristu nogulsnēs. Etanolu nolej un aizstāj ar 400 µl 70 % molekulārās kategorijas etanola, centrifugē ar 13 000 apgriezienu minūtē piecas minūtes un DNS granulu izšķīdina 50 µl ūdens, kas brīvs no molekulārās DNāzes un RNāzes. Arī šoreiz, ja izmanto cietos audus (krūšu spuru), pirms DNS ekstrakcijas paraugu var būt nepieciešams homogenizēt līzes buferšķīdumā, lietojot *FastPrep*® audu līzeri vai citu līdzvērtīgu audu sagraušanas sistēmu.

3. DNS uzglabā – 20 °C temperatūrā, kamēr tā ir nepieciešama.

Svarīga piezīme: procedūras laikā jāvalkā cimdi.

Polimerāzes ķēdes reakcijas *(PCR)* analīze

Amplifikāciju veic, izmantojot 2,5 µl DNS ekstrakta 50 µl reakcijas tilpumā, un tad lieto *Idh* lokusa praimerus (kā izklāstīts izdevumā: *Peichel et al.*, 2004, *Current Biology*, 1:1416-1424).

Augšupejošais praimers	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Apgrieztais praimers	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Piemērotus *PCR* reaģentus piegādā daudzi piegādātāji. Turpmāk izklāstīto metodi pašlaik izmanto *Cefas Weymouth* laboratorijā.

1. *"Reakcijas maisījuma" pagatavošana (50 µl katram paraugam)*

Turpmāk izklāstīts, kā pagatavo pamatmaisījumu. To var pagatavot jau iepriekš un uzglabāt sasaldētu –20 °C temperatūrā, kamēr tas ir nepieciešams. Pagatavo pietiekami daudz pamatmaisījuma, lai varētu veikt negatīvo kontroli (tikai molekulārās bioloģijas kategorijas ūdenī).

	Tilpums (krājuma konc.)/ piemērs	Galīgā koncentrācija
5 x *GoTaq*® reakcijas buferšķīdums	10 µl	1 x
$MgCl_2$	5 µl (25 mm)	2,5 mm
Nukleotīdi (dATP, dCTP, dGTP un dTTP)	0,5 µl (25 mm katrs)	250 µM katrs
Augšupejošais praimers	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Apgrieztais praimers	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Molekulārās bioloģijas kategorijas ūdens	30,75 µl	
GoTaq polimerāze	0,25 µl	1,25 U

— Iepilda 47,5 µl marķētā *PCR* mēģenē ar 0,5 ml plānu sienu.

— Pienācīgi marķētā mēģenē pievieno 2,5 µl attīrītas DNS. Atkārto visiem paraugiem un negatīvajai kontrolei.

— Pārlej ar diviem pilieniem minerāleļļas. Kā alternatīvu izmanto termokameru ar apsildāmu vāku.

— Aizver vākus.

— Paraugus denaturē Peltjē *PTC-225* termokamerā 94 ± 2 °C temperatūrā piecas minūtes, tad veic 39 ciklus 94 ± 2 °C temperatūrā pa vienai minūtei, 55 ± 2 °C temperatūrā pa vienai minūtei un 72 ± 2 °C temperatūrā pa vienai minūtei, kā arī galīgo paplašināšanu 72 ± 2 °C temperatūrā 10 minūtes.

2. *Agarozes gela (2 %) pagatavošana*

Parasti *PCR* produktus izšķīdina 20 % agarozes gelā, kas satur etīdija bromīdu.

Var izmantot arī kapilārās elektroforēzes sistēmas.

— Nosver 2 g agarozes 100 ml 1 × *TAE* buferšķīduma.

— Silda mikroviļņos (aptuveni 2–3 min.), lai izšķīdinātu agarozi.

— Pievieno divus pilienus etīdija bromīda ar galīgo koncentrāciju 0,5 µg/ml.

— Ielej karsto šķīdumu gela liešanas iekārtā.

— Ļauj gelam sacietēt.

3. *Gela elektroforēze*

— Ielej agarozes gelu elektroforēzes iekārtā un iemērc 1 × *TAE* buferšķīdumā.

— Ievieto 20 µl katra parauga atsevišķā joslā, pievienojot molekulārā svara marķieri (100 bp DNS kāpņu *Promega*) rezerves joslā.

— Elektroforēzi veic pie 120 V 30–45 minūtes.

▼**M6**

4. *Paplašināšanas produktu vizualizācija*

Ja etīdija bromīds ir iekļauts agarozes gelā, kā iepriekš minēts, DNS produktus vizualizē ultravioletās gaismas avotā. Agarozes gelu var arī iekrāsot, pārklājot gelu etīdija bromīda atšķaidītā šķīdumā (0,5 μg/ml ūdenī) 30 minūtes pirms vizualizācijas.

▼M6

11. papildinājums

Norādījumi trīsadatu stagara mākslīgās apaugļošanas procedūrai

Šīs nodaļas mērķis ir raksturot procedūras, kā iegūt apaugļotus trīsadatu stagara ikrus, lai tās izmantotu *FSDT*.

Procedūras

Spermas ieguve no tēviņiem

1. Eitanazē spilgti iekrāsotu izvēlētās populācijas tēviņu.

2. Sēkliniekus atdala no abiem zivs sāniem. *Sēkliniekiem parasti ir izteikta pigmentācija un stienīšu formas struktūras, kas viegli saskatāmas pie ķermeņa sānu viduslīnijas*. Lieto kādu no turpmāk izklāstītajām metodēm.

3. Ar nelielām šķērītēm, sākot no kloākas, vienā griezienā izveido 1–1,5 cm garu iegriezumu aptuveni 45 grādu leņķī.

4. Ar skalpeli izveido nelielu iegriezumu zivs sānos uzreiz aiz iegurņa un sānu plātnēs nedaudz uz vēdera pusi.

5. Sēkliniekus izņem ar mazu pinceti un ievieto Petri platē.

6. Katru sēklinieku pārlej ar 100 µl svaigi pagatavota **Henka gala šķīduma** ([1]).

7. Sēkliniekus smalki sagriež gabaliņos ar žileti vai skalpeli. Tādējādi izdalīsies sperma un Henka šķīdums iegūs pienainu izskatu.

8. Šķidrumu, kas satur spermu, ielej mēģenē, vienlaikus cenšoties neielaist tajā nevienu sēklinieku audu gabaliņu, kad rīkojas ar pipeti.

9. 800 µl Henka gala šķīduma ielej mēģenē un rūpīgi samaisa.

10. Ja nepieciešams, tēviņu var saglabāt, fiksējot to 100 % etanolā vai citā vēlamā fiksācijas šķīdumā. Tas ir īpaši svarīgi, ja pētījumā nosaka vecākus, no kuriem cēlušies pēcnācēji.

Svarīga piezīme: *kaut arī lielākā daļa nepieciešamo izejšķīdumu ir sagatavojami iepriekš,* ***5. bāze*** *un līdz ar to arī* ***gala šķīdums*** *ir jāpagatavo* ***svaigs*** *lietošanas dienā.*

1. bāze	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilēts ūdens *(DW)*	100 ml
2. bāze	
Na_2HPO_4 (bezūdens)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Destilēts ūdens	100 ml
3. bāze	
$CaCl_2$	0,72 g
Destilēts ūdens	50 ml

([1]) Henka buferētais sāls šķīdums *(HBSS)* –

HBSS ir nepieciešams spermas saglabāšanai laikā, kad notiek gatavošanās apaugļošanai.

▼**M6**

4. bāze

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
Destilēts ūdens	50 ml

5. bāze (svaigi pagatavota)

$NaHCO_3$	0,35 g
Destilēts ūdens	10 ml

Piezīme. Ja jums jau ir kādi no iepriekš minētajiem sāļiem, bet ar citu ūdens saturu (t. i., $2H_2O$, nevis bezūdens), varat tomēr tos lietot, taču pirms tam pielāgojiet svaru, pamatojoties uz molekulāro svaru).

Henka gala šķīdumā kombinēšanas secība ir šāda:

1. bāze	1,0 ml
2. bāze	0,1 ml
3. bāze	0,1 ml
Destilēts ūdens	8,6 ml
4. bāze	0,1 ml
5. bāze	0,1 ml

Pirms lietošanas rūpīgi samaisa.

Apaugļošana

1. Vēlamajā populācijā atlasa lielas nobriedušas mātītes; tās ir gatavas ikru izspiešanai tikai tad, kad redzat no kloākas uz āru izvirzītus ikrus. Gatavām mātītēm ir raksturīga "paceltas galvas" poza.

2. Viegli bīda rādītājpirkstu vai īkšķi lejup gar zivs sānu astes virzienā, lai stimulētu ikru maisa izkrišanu svaigā Petri platē. Atkārto no otra sāna un ievieto zivi atpakaļ traukā.

3. Ikrus var izkliedēt (izveidojot vienu slāni) ar smalku otiņu. Būtiski ir censties pakļaut spermas iedarbībai iespējami daudzus ikrus, nodrošinot maksimāli plašu ikru virsmu. Svarīga piezīme: nodrošiniet ikriem mitrumu, pārklājot tos ar samitrinātu salveti (ir svarīgi, lai ikri tieši nesaskartos ar ūdeni, kas var priekšlaikus nocietināt horionu, neļaujot apaugļoties). Mātītes var saražot ļoti atšķirīgu ikru skaitu, taču vidēji no vienas nobriedušas mātītes var viegli iegūt aptuveni 150 ikrus.

4. 25 µl spermas Henka maisījumā ar otiņu vienmērīgi izkliedē pāri visu ikru virsmai. Kad apaugļošana sāksies, ikri strauji sacietēs un mainīs krāsu (vienas minūtes laikā). Ja aplēstais ikru skaits pārsniedz 150, atkārtojiet minēto procedūru. Tāpat, ja ikri nesacietē vienas minūtes laikā, pievienojiet nedaudz vairāk spermas. Svarīga piezīme: spermas daudzuma palielināšana ne vienmēr uzlabo apaugļošanas ātrumu.

5. Ikru un spermas šķīdumu atstāj "mijiedarbībai" vismaz uz 15 minūtēm, un apaugļotos ikrus ievieto ekspozīcijas akvārijā 1,5 stundu laikā pēc apaugļošanas.

6. Šo procedūru atkārto ar citu mātīti, kamēr ir savākts vēlamais ikru skaits.

7. Rezervē dažus ikrus no pēdējās partijas, un fiksē tos 10 % etiķskābē.

▼M6

Ikru skaitīšana un izkliedēšana testa akvārijā

1. Ikri vienmērīgi jāizkliedē starp visiem apstrādes līmeņiem, lai nepieļautu ģenētiskas novirzes. Visas apaugļoto ikru partijas sadala vienāda lieluma grupās (atbilstoši apstrādes līmeņu skaitam), izmantojot neasu instrumentu (t. i., platasmens entomoloģijas pinceti vai potēšanas cilpu). Ja mērķis katrā apstrādē ir četri replikāti ar 20 ikriem katrā, tad ekspozīcijas akvārijā jāizkliedē 80 ikri. Svarīga piezīme: ieteicams pievienot papildu 20 % (t. i., 96 ikrus katrā apstrādes līmenī), kamēr esat drošs, ka nodrošināsiet 100 % apaugļošanu.

2. Stagara ikri ārpus tēva apsargātās ligzdas ir ļoti uzņēmīgi pret sēnīšu infekcijām. Tādēļ ir īpaši būtiski pirmās piecas testēšanas dienas apstrādāt visus ikrus ar metilēnzilo. Metilēnzilā izejšķīdumu sagatavo kā 1 mg/ml un ielej ekspozīcijas akvārijā, lai maksimālā gala koncentrācija būtu 2,125 mg/l. Svarīga piezīme: stagarus nedrīkst apstrādāt ar metilēnzilo pēc izšķilšanās, lai pēc sestās dienas sistēma būtu brīva no metilēnzilā.

3. Ikrus pārbauda katru dienu, un reģistrē visus mirušos vai neapaugļotos ikrus. Svarīga piezīme: pirms izšķilšanās ikri nedrīkst atrasties ārpus ūdens, pat ne uz ļoti īsu brīdi.

▼**M6**

C.42. BIONOĀRDĀMĪBA JŪRAS ŪDENĪ

VISPĀRĪGS IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (TG) 306 (1992. gads). Kad tika izstrādātas oriģinālās testēšanas metodes, nebija zināms, kādā mērā jūras videi var piemērot rezultātus, ko sniedz skrīninga testi attiecībā uz tūlītēju bionoārdāmību, kā inokulātu izmantojot saldūdeni, notekūdeņu efluentu vai aktivētās dūņas. Ir saņemti ziņojumi par atšķirīgiem rezultātiem šajā jomā (piem., (1)).

2. Daudzi industriālie notekūdeņi, kas satur dažādas ķīmiskās vielas, nonāk jūrā kā tiešas ieplūdes vai ar grīvu un upju starpniecību, kur to atrašanās ilgums ir neliels, salīdzinot ar laikposmu, kas nepieciešams daudzu klātesošo ķīmisko vielu pilnīgai bioloģiskai noārdīšanai. Arvien paaugstinoties izpratnei par nepieciešamību aizsargāt jūras vidi pret augošo ķīmisko vielu slodzi un nepieciešamību novērtēt ķīmisko vielu varbūtējo koncentrāciju jūrā, tika izstrādātas testēšanas metodes attiecībā uz bionoārdāmību jūras ūdenī.

3. Šeit raksturotās metodes izmanto dabisko jūras ūdeni gan kā ūdens, gan kā mikroorganismu avotu. Cenšoties nodrošināt atbilstību metodēm attiecībā uz tūlītēju bionoārdāmību saldūdenī, tika pētīta īpaši filtrēta un centrifugēta jūras ūdens izmantošana, kā arī jūras sedimentu izmantošana par inokulātu. Šie pētījumi bija nesekmīgi. Tādēļ testēšanas barotne ir dabisks jūras ūdens, kas iepriekš attīrīts, lai aizvāktu rupjās daļiņas.

4. Lai novērtētu galīgo bionoārdāmību ar "kolbu kratīšanas" metodi, ir jānodrošina salīdzinoši augstas testējamās vielas koncentrācijas, jo izšķīdušā organiskā oglekļa *(DOC)* analītiskajai metodei ir vāja jutība. Savukārt tādēļ jūras ūdenim ir nepieciešams pievienot minerālvielas (N un P), kuru zemā koncentrācija pretējā gadījumā ierobežotu *DOC* noārdīšanu. Arī izmantojot "slēgtās pudeles" metodi, pievienotās testējamās vielas koncentrācijas dēļ nepieciešams pievienot uzturvielas.

5. Tādējādi šīs metodes nav testi tūlītējas bionoārdāmības noteikšanai, jo papildus jūras ūdenī jau esošajiem mikroorganismiem netiek pievienots nekāds inokulāts. Šie testi arī nemodelē jūras vidi, jo tiek pievienotas uzturvielas un testējamās vielas koncentrācija ir daudz augstāka nekā tā būtu jūrā. Šo iemeslu dēļ minētās metodes tiek piedāvātas jaunā apakšnodaļā "Bionoārdāmība jūras ūdenī".

PIEMĒROŠANA

6. Pirmo iespaidu par bionoārdāmību jūras ūdenī sniedz tādu testu rezultāti, kurus veic tādēļ, ka attiecīgās vielas lietošanas un likvidēšanas modelis liecina par tās nonākšanu jūrā. Ja rezultāts ir pozitīvs (> 70 % *DOC* noārdīšana; > 60 % *ThOD* – teorētiskais skābekļa patēriņš), var secināt, ka jūras vidē ir bioloģiskās noārdīšanās potenciāls. Tomēr arī negatīvs rezultāts neizslēdz šādu potenciālu, bet liecina, ka ir nepieciešama papildu izpēte, piem., izmantojot iespējami zemāku testējamās vielas koncentrāciju.

▼M6

7. Jebkurā gadījumā, ja nepieciešama konkrētāka vērtība, kas raksturo bioloģiskās noārdīšanās ātrumu vai pakāpi jūras ūdenī kādā konkrētā vietā, jāizmanto citas, kompleksākas un sarežģītākas un tādēļ arī dārgākas metodes. Piemēram, var veikt modelēšanas testu ar tādu testējamās vielas koncentrāciju, kas ir tuvāka iespējamai koncentrācijai vidē. Tāpat var izmantot arī nebagātinātu un iepriekš neattīrītu jūras ūdeni, kas ņemts no interesējošās vietas, un primāro bionoārdīšanos var pētīt īpašā ķīmiskā analīzē. Galīgo bionoārdāmību var izpētīt, lietojot vielas ar ^{14}C marķējumu, lai varētu izmērīt izšķīdinātā organiskā ^{14}C izzušanas ātrumu un $^{14}CO_2$ veidošanās ātrumu videi reālistiskās koncentrācijās.

METOŽU IZVĒLE

8. Piemērojamās metodes izvēle ir atkarīga no vairākiem apstākļiem; izvēli atvieglos turpmāk sniegtā tabula. Vielas, kuru šķīdība ūdenī ir zemāka par aptuveni 5 mg C/l ekvivalentu, nevar testēt ar "kolbu kratīšanas" metodi, bet grūti šķīstošās vielas vismaz principā var testēt ar "slēgtās pudeles" metodi.

Tabula.

"Kolbu kratīšanas" testa un "slēgtās pudeles" testa priekšrocības un trūkumi

METODE	PRIEKŠROCĪBAS	TRŪKUMI
KOLBU KRATĪŠANA	— vienkārša aparatūra, izņemot C analizatoru — 60 dienu ilgums nerada problēmas — netraucē nitrifikācija — var pielāgot gaistošām vielām	— nepieciešams C analizators — patērē 5–40 mg *DOC/l*, varētu būt inhibējoša — *DOC* noteikšana jūras ūdenī ir apgrūtināta zemā koncentrācijā (hlorīda efekts) — jūras ūdenī dažkārt ir augsta *DOC* koncentrācija
SLĒGTĀ PUDELE	— vienkārša aparatūra — vienkārša galīgā noteikšana — izmanto zemu testējamās vielas koncentrāciju (2 mg/l), tādēļ mazāka inhibēšanas iespēja — viegli pielāgojama gaistošām vielām	— var būt grūti uzturēt gaisa necaurlaidību pudelēm — masveidīgs baktēriju pieaugums var izraisīt kļūdainas vērtības — tukšās O_2 uzņemšanas vērtības var būt augstas, jo īpaši pēc 28 dienām; to var novērst, ļaujot jūras ūdenim nostāvēties — iespējami traucējumi, ko radīs O_2 uzņemšana nitrifikācijas rezultātā

"KOLBU KRATĪŠANAS" METODE

IEVADS

1. Šī metode ir grozītā ESAO skrīninga testa, kas aprakstīts šā pielikuma C.4B. nodaļā (2), variants jūras ūdenī. Tā tika izstrādāta starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātā, kuru Eiropas Komisijas (EK) uzdevumā organizēja Dānijas Ūdens kvalitātes institūts (3).

2. Tāpat kā saistītajā "slēgtās pudeles" metodē ar jūras ūdeni šā testa rezultāti nav uzskatāmi par tūlītējas bionoārdāmības rādītājiem, bet ir jāizmanto tikai informācijas iegūšanai par vielu bionoārdāmību jūras vidē.

▼**M6**

METODES PRINCIPS

3. Iepriekš noteiktu testējamās vielas daudzumu izšķīdina testēšanas barotnē, lai iegūtu izšķīdinātā organiskā oglekļa (*DOC*)/l 5–40 mg koncentrāciju. Ja organiskā oglekļa analīzes jutīguma robežas ir uzlabotas, sekmīgāka var būt zemākas testējamās vielas koncentrācijas izmantošana, jo īpaši attiecībā uz inhibējošām vielām. Testējamās vielas šķīdumu testa barotnē pakļauj inkubācijai, maisot tumsā vai izkliedētā gaismā aerobos apstākļos fiksētā temperatūrā (kontrolējot līdz ± 2 °C), kas parasti būs diapazonā 15–20 °C. Ja pētījuma mērķis ir modelēt vides situācijas, testus var veikt ārpus šā normālā temperatūras diapazona. Ieteicamais maksimālais testēšanas ilgums ir aptuveni 60 dienas. Pēc noārdīšanās veic *DOC* mērījumus (galīgā noārdīšanās) un dažos gadījumos – īpašu analīzi (primārā noārdīšanās).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

4. Lai uzzinātu, vai konkrētai vielai var veikt attiecīgo testu, jāzina vairākas tās īpašības. Jānosaka organiskā oglekļa saturs vielā, un tās gaistamībai jābūt tādai, lai testa gaitā nerastos būtiski zudumi, bet šķīdībai ūdenī jābūt lielākai par 25–40 mg C/l ekvivalentu. Testējamā viela arī nedrīkst būtiski adsorbēt uz stikla virsmām. Iegūto rezultātu interpretēšanai vajadzīga informācija par testējamās vielas tīrību vai galveno sastāvdaļu salīdzinošajām proporcijām, jo īpaši gadījumos, kad rezultāti ir tuvi "pieņemamam" līmenim.

5. Piemērotāko testa koncentrāciju izvēlei var noderēt informācija par testējamās vielas toksisko iedarbību uz baktērijām, piem., īstermiņa elpošanas ātruma testa (4) mērījumi, un tā var būt svarīga bionoārdāmības zemo vērtību pareizai interpretēšanai. Tomēr ne vienmēr ar šo informāciju pietiek, lai interpretētu bioloģiskās noārdīšanās testa rezultātus, un 18. punktā izklāstītā procedūra ir piemērotāka.

STANDARTVIELAS

6. Pārbaudot jūras ūdens parauga mikrobiālo aktivitāti, jāizmanto piemērotas standartvielas. Šim nolūkam var izmantot tādas vielas kā nātrija benzoāts, nātrija acetāts un anilīns. Standartvielām ir jānoārdās pietiekami īsā laikā, pretējā gadījumā ir ieteicams atkārtot testu ar citu jūras ūdens paraugu.

7. EK starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, kurai jūras ūdens paraugi tika ņemti dažādās vietās un dažādos gadalaikos (3), adaptācijas (*lag*) fāze (t_L) un laiks, kad jāsasniedz 50 % noārdīšanās (t_{50}), izņemot adaptācijas fāzi, ilga no 1 līdz 4 dienām un nātrija benzoātam – attiecīgi no 1 līdz 7 dienām. Anilīnam t_L bija no 0 līdz 10 dienām, bet t_{50} – no 1 līdz 10 dienām.

METODES ATKĀRTOJAMĪBA UN JUTĪBA

8. Metodes atkārtojamība tika noteikta starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3). Testējamās vielas zemāko koncentrāciju, kurai var izmantot šo metodi ar *DOC* analīzi, lielākoties nosaka organiskā oglekļa analīzes detektēšanas robeža (pašlaik aptuveni 0,5 mg C/l) un izšķīdinātā organiskā oglekļa koncentrācija izmantotajā jūras ūdenī (parasti aptuveni 3–5 mg/l ūdenim, kas ņemts atklātā jūrā). *DOC* fona koncentrācija nedrīkst pārsniegt aptuveni 20 % kopējās *DOC* koncentrācijas pēc testējamās vielas pievienošanas. Ja

▼M6

tas nav iespējams, *DOC* fona koncentrāciju dažkārt var samazināt, nostādinot jūras ūdeni pirms testēšanas. Ja šo metodi lieto tikai ar īpašo ķīmisko analīzi (ar ko mēra primāro noārdīšanos), pētniekam, sniedzot papildu informāciju, ir jādokumentē, vai ir paredzama galīgā noārdīšanās. Šī papildu informācija var sastāvēt no citu testu rezultātiem attiecībā uz tūlītēju vai raksturīgu bionoārdāmību.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

9. Parastais laboratorijas aprīkojums un:

a. laboratorijas kratītājs, kurā ietilpst 0,5–2 litru Erlenmeijera kolbas ar automātisku temperatūras kontroli vai tāds, ko izmanto konstantas 15–20 °C temperatūras telpā, kontrolējot ± 2 °C robežās;

b. 0,5–2 litru Erlenmeijera kolbas ar šauru kaklu;

c. membrānfiltrācijas aparāts vai centrifūga;

d. membrānfiltri, 0,2–0,45 μm;

e. oglekļa analizators;

f. iekārtas specifiskām analīzēm (pēc izvēles).

Jūras ūdens

10. Paņem jūras ūdens paraugu rūpīgi iztīrītā konteinerā, un nogādā to laboratorijā, vislabāk – vienas vai divu dienu laikā pēc parauga paņemšanas. Pārvadāšanas laikā parauga temperatūrai neļauj būtiski pārsniegt testa gaitā piemēroto temperatūru. Precīzi atzīmē parauga ņemšanas vietu, un raksturo tās piesārņotību un uzturvielu pieejamību. Jo īpaši attiecībā uz piekrastes ūdeņiem šajā raksturojumā iekļauj heterotrofo mikroorganismu koloniju skaitu un izšķīdušo nitrātu, amonjaka un fosfātu noteiktās koncentrācijas.

11. Par pašu jūras ūdens paraugu sniedz šādu informāciju:

— parauga ņemšanas datums;

— ņemšanas dziļums;

— parauga izskats – duļķains utt.;

— temperatūra parauga ņemšanas laikā;

— sāļums;

— *DOC*;

— laiks starp parauga paņemšanu un izmantošanu testā.

12. Ja konstatē, ka *DOC* saturs jūras ūdens paraugā ir augsts (8. punkts), pirms lietošanas jūras ūdeni ieteicams nostādināt aptuveni vienu nedēļu. Nostādina, uzglabājot aerobos apstākļos testēšanas temperatūrā un tumsā vai izkliedētā gaismā. Ja nepieciešams, aerobos apstākļus uztur ar vieglu aerāciju. Nostādināšanas laikā samazinās viegli noārdāmā organiskā materiāla saturs. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3) netika konstatēta nekāda

▼M6

atšķirība starp nostādināta un svaigi paņemta jūras ūdens parauga noārdīšanās potenciālu. Jūras ūdeni pirms lietošanas iepriekš apstrādā, lai aizvāktu rupjās daļiņas, piem., filtrējot caur neilona filtru vai raupja papīra filtru (nelieto membrānas vai *GFC* filtrus), vai sedimentējot un dekantējot. Izmantotā procedūra ir jānorāda. Iepriekšēju apstrādi veic pēc nostādināšanas, ja to izmanto.

Minerālvielu izejšķīdumi

13. No analītiskas tīrības pakāpes reaģentiem pagatavo šādus izejšķīdumus.

a) Kālija dihidrogēnortofosfāts, KH_2PO_4 8,50 g

Dikālija hidrogēnortofosfāts, K_2HPO_4 21,75 g

Dinātrija hidrogēnortofosfāta dihidrāts, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,30 g

Amonija hlorīds, NH_4Cl 0,50 g

Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram

b) Kalcija hlorīds, $CaCl_2$ 27,50 g

Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram

c) Magnija sulfāta heptahidrāts, $mgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram

d) Dzelzs (III) hlorīda heksahidrāts, $FeCl_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram

Nogulsnēšanos d) šķīdumā var novērst, pievienojot vienu pilienu koncentrēta HCl vai 0,4 g etilēnediaminetetra-etiķskābes (*EDTA*, dinātrija sāls) uz litru. Ja nogulsnes veidojas izejšķīdumā, to nomaina ar svaigi pagatavotu šķīdumu.

Testēšanas barotnes sagatavošana

14. Pievieno 1 ml katra iepriekš minētā izejšķīduma uz litru iepriekš apstrādāta jūras ūdens.

Inokulāts

15. Nepievieno nekādu citu inokulātu papildus tiem mikroorganismiem, kas jau atrodas jūras ūdenī. (Pēc izvēles) nosaka kolonijas veidojošo heterotrofu skaitu jūras ūdens testēšanas barotnē (un vislabāk arī oriģinālajos jūras ūdens paraugos), piem., pēc dzīvotspējīgo mikroorganismu skaita, izmantojot jūras agaru. Tas ir īpaši vēlams paraugiem no piekrastes vai piesārņotām vietām. Pārbauda heterotrofo mikroorganismu aktivitāti jūras ūdenī, veicot testu ar standartvielu.

▼M6

Kolbu sagatavošana

16. Nodrošina visu stikla trauku prefektu tīrību, bet ne vienmēr sterilitāti (piem., izmantojot spirta hlorūdeņražskābi), pirms lietošanas tos noskalo un nožāvē, lai nepieļautu piesārņošanos ar iepriekšējo testu atliekām. Kolbas vēlreiz iztīra pirms pirmās lietošanas.

17. Testējamās vielas vienlaikus novērtē divās kolbās, kā arī standartvielu atsevišķā kolbā. Divreiz veic tukšu testu bez testējamās vielas un bez standartvielas, lai noteiktu analītiskās kontroles. Izšķīdina testējamās vielas testēšanas barotnē, un tās ir ērti pievienot ar koncentrēta izejšķīduma starpniecību, nodrošinot vēlamās sākuma koncentrācijas, kas parasti ir 5–40 mg *DOC/l*. Parasti standartvielas testē ar sākuma koncentrāciju, kas atbilst 20 mg *DOC/l*. Ja izmanto testējamo un/vai standartvielu izejšķīdumus, nodrošina, lai jūras ūdens barotnes sāļums būtiski nemainītos.

18. Ja ir paredzama toksiska iedarbība vai to nav iespējams novērst, testēšanas plānā ieteicams iekļaut arī divreizēju inhibēšanas eksperimentu. Testējamās un standartvielas ielej tajā pašā traukā, parasti paredzot tādu pašu standartvielas koncentrāciju kā kontroltestā (t. i., 20 mg *DOC/l*), lai varētu salīdzināt.

19. Izšķīdina pietiekamus testēšanas šķīdumu daudzumus Erlenmeijera kolbās (piemērots apjoms ir aptuveni puse kolbas tilpuma), un pēc tam noslēdz katru kolbu ar vaļīgu vāciņu (piem., no alumīnija folijas), nodrošinot gāzes apmaiņas iespēju starp kolbu un apkārtējo gaisu. (Veicot *DOC* analīzi, kokvilnas vates aizbāžņi nav piemēroti.) Ievieto traukus kratītājā un vienmērīgi krata ar nelielu ātrumu (piem., 100 apgriezieniem minūtē) visu testa laiku. Kontrolē temperatūru (15–20 °C, nepārsniedzot ± 2 °C), un aizsedz traukus no gaismas, lai nepieļautu aļģu augšanu. Nodrošina, lai gaisā nebūtu toksisku materiālu.

Fizikāli ķīmiskās kontroles tests (pēc izvēles)

20. Ja ir aizdomas par abiotisku noārdīšanos vai zudumu mehānismiem, piem., hidrolīzi (šī problēma saistās tikai ar īpašo analīzi), izgarošanu vai adsorbciju, ieteicams veikt fizikāli ķīmiskās kontroles eksperimentu. To var izdarīt, pievienojot dzīvsudraba (II) hlorīdu ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) traukos ar testējamo vielu, lai apturētu mikrobiālo aktivitāti. Būtisks *DOC* vai īpašās vielas koncentrācijas samazinājums fizikāli ķīmiskās kontroles testā liecina par abiotiskiem noārdīšanas mehānismiem. (Lietojot dzīvsudraba hlorīdu, īpaša uzmanība jāpievērš traucējumiem vai katalizatora saindēšanai *DOC* analīzē.)

Kolbu skaits

21. Parasti testos izmanto šādas kolbas:

1. un 2. kolba – satur testējamo vielu (testējamo suspensiju);

3. un 4. kolba – satur tikai jūras ūdeni (kontroltests);

5. kolba – satur standartvielu (procedūras kontrolei);

6. kolba – satur testējamo un standartvielu (toksiskuma kontrolei), pēc izvēles;

7. kolba – satur testējamo vielu un sterilizācijas līdzekli (abiotiskai sterilitātes kontrolei), pēc izvēles.

([1]) Dzīvsudraba (II) hlorīds ($HgCl_2$) ir ļoti toksiska viela, kas jāpārvieto ar pienācīgu piesardzību. Šķidrie atkritumi, kas satur šo ķīmisko vielu, atbilstoši jādeponē; tos nedrīkst izliet kanalizācijas sistēmā.

▼M6

***DOC* analīze**

22. Testa gaitā piemērotos laika intervālos izņem paraugus *DOC* analīzei (1. papildinājums). Paraugus vienmēr izņem testa sākumā (0. dienā) un 60. dienā. Lai raksturotu noārdīšanās secību laikā, kopumā ir nepieciešami vismaz pieci paraugi. Nav iespējams noteikt nemainīgu laika grafiku paraugu ņemšanai, jo bioloģiskās noārdīšanās ātrums ir mainīgs. Katram paraugam *DOC* noteikšanu veic divreiz.

Paraugu ņemšana

23. Nepieciešamais paraugu lielums ir atkarīgs no analītiskās metodes (konkrētās analīzes), izmantotā oglekļa analizatora un procedūras (membrānfiltrēšana vai centrifugēšana), kas izvēlēta parauga apstrādei pirms oglekļa noteikšanas (25. un 26. punkts). Pirms parauga ņemšanas pārliecinās, vai testēšanas barotne ir rūpīgi samaisīta un jebkurš materiāls, kas pielipis kolbas sienai, ir izšķīdis vai novākts.

24. Membrānfiltrēšanu vai centrifugēšanu veic uzreiz pēc parauga paņemšanas. Ja nepieciešams, filtrētos vai centrifugētos paraugus uzglabā 2–4 °C temperatūrā līdz 48 stundām vai zemāk par –18 °C temperatūru – ilgāku laiku (ja ir zināms, ka viela netiks ietekmēta, pirms uzglabāšanas to skābina līdz pH 2).

25. Membrānfiltri (0,2–0,45 μm) ir derīgi, nodrošinot, ka tie neizdala oglekli un neadsorbē vielu filtrēšanas posmā, piem., polikarbonāta membrānfiltri. Daži membrānfiltri ir piesūcināti ar virsmaktīvām vielām to hidrofilizācijai un var izdalīt ievērojamu daudzumu izšķīdināta oglekļa. Šādus filtrus sagatavo, vārot dejonizētā ūdenī trīs vienu stundu ilgus periodus pēc kārtas. Pēc vārīšanas šos filtrus uzglabā dejonizētajā ūdenī. Pirmos 20 ml filtrāta izlej.

26. Paraugu centrifugēšanu var izvēlēties kā alternatīvu membrānfiltrēšanai. Centrifugē ar 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) 15 minūtes, vislabāk – atdzesētā centrifūgā.

Piezīme. Šķiet, ka kopējā organiskā oglekļa *(TOC)* diferencēšana pa visu *DOC (TOC/DOC)*, centrifugējot ar ļoti zemām koncentrācijām, nelīdzēs, jo visas baktērijas netiks aizvāktas, vai arī ogleklis kā baktēriju plazmas daļa tiks no jauna izšķīdināts. Šķiet arī, ka, paaugstinot testa koncentrācijas (> 10 mg C uz litru), centrifugēšanas kļūda būs salīdzinoši neliela.

Paraugu ņemšanas biežums

27. Ja analīzes veic uzreiz pēc parauga paņemšanas, nākamreiz ņemot paraugu, ņem vērā arī šo analīžu rezultātu.

28. Ja paraugus saglabā (24. punkts), lai analizētu vēlāk, paņem vairāk paraugu, nevis tikai nepieciešamo minimālo skaitu, piecus. Vispirms analizē pēdējos paraugus, un veicot piemērotu paraugu pakāpeniski "atpakaļejošu" atlasi analīzei, ir iespējams iegūt pareizu aprakstu par bioloģiskās noārdīšanās līkni ar salīdzinoši nedaudzām analītiskām darbībām. Ja līdz testa beigām vispār nenotiek nekāda noārdīšanās, papildu paraugi nav jāanalizē, un šādā situācijā "atpakaļejošā" stratēģija var ietaupīt būtiskas analīzes izmaksas.

▼M6

29. Ja noārdīšanās līknes stacionāro fāzi konstatē pirms 60. dienas, testu beidz. Ja noārdīšanās kā parasti sākas pirms 60. dienas, bet nav sasniegusi stacionāro fāzi, eksperimentu pagarina vēl uz vienu periodu.

DATI UN ZIŅOŠANA

Rezultātu apstrāde

30. Analīžu rezultātus reģistrē pievienotajā datu lapā (2. papildinājums), un bioloģiskās noārdīšanās vērtības aprēķina gan testējamai vielai, gan standartvielai, izmantojot vienādojumu:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

kur:

D_t = *DOC* procentuālā noārdīšanās vai konkrētas vielas noārdīšanās laikā t;

C_o = *DOC* vai konkrētas vielas sākuma koncentrācija testēšanas barotnē;

C_t = *DOC* vai konkrētas vielas koncentrācija testēšanas barotnē laikā t;

$C_{bl(0)}$ = *DOC* vai konkrētas vielas sākuma koncentrācija tukšajā testā;

$C_{bl(t)}$ = *DOC* vai konkrētas vielas koncentrācija tukšajā testā laikā t.

31. Noārdīšanos norāda kā noārdītā *DOC* procentu (galīgā noārdīšanās) vai noārdījušās konkrētās vielas procentu (primārā noārdīšanās) laikā t. *DOC* koncentrācijas aprēķina līdz tuvākajam 0,1 mg uz litru, bet D_t vidējās vērtības noapaļo līdz tuvākajam veselajam procentam.

32. Noārdīšanās gaitu grafiski ilustrē shēmā, kā parādīts attēlā nodaļā "Rezultātu derīgums un interpretācija". Ja datu pietiek, no līknes aprēķina adaptācijas fāzi (t_L) un laiku, kas nepieciešams, lai sasniegtu 50 % noārdīšanos, sākot no adaptācijas fāzes beigām (t_{50}).

Testēšanas pārskats

33. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības;

— identifikācijas dati.

Testēšanas apstākļi:

— paraugu ņemšanas vietas novietojums un apraksts; piesārņojuma un uzturvielu situācija (koloniju skaits, nitrāti, amonjaks un fosfāti, ja attiecināms);

— parauga īpašības (paņemšanas datums, dziļums, izskats, temperatūra, sāļums, *DOC* (pēc izvēles)), laiks starp parauga paņemšanu un izmantošanu testā;

▼M6

— izmantotā metode (ja ir) jūras ūdens nostādināšanai;

— izmantotā metode jūras ūdens iepriekšējai apstrādei (filtrēšana/sedimentācija);

— izmantotā metode *DOC* noteikšanai;

— izmantotā metode specifiskajai analīzei (pēc izvēles);

— izmantotā metode heterotrofu skaita noteikšanai jūras ūdenī (dzīvotspējīgo mikroorganismu skaita metode vai cita procedūra) (pēc izvēles);

— citas metodes (pēc izvēles), ko izmanto jūras ūdens raksturošanai (*ATP* mērījumi utt.).

Rezultāti:

— analīzes dati ir paziņoti datu lapā (2. papildinājums);

— noārdīšanās testa gaita ir grafiski attēlota shēmā, kas parāda adaptācijas fāzi (t_L), tendenci un laiku (sākot no adaptācijas fāzes beigām), kas nepieciešams 50 % noārdīšanās sasniegšanai (t_{50}). Afaptācijas fāzi var aplēst grafiski, kā parādīts attēlā nodaļā "Rezultātu derīgums un interpretācija", vai arī ērti pieņemt kā laiku, kas nepieciešams, lai noārdītos par 10 procentiem;

— procentuālā noārdīšanās ir izmērīta pēc 60 dienām vai testa beigās.

Rezultātu apspriešana.

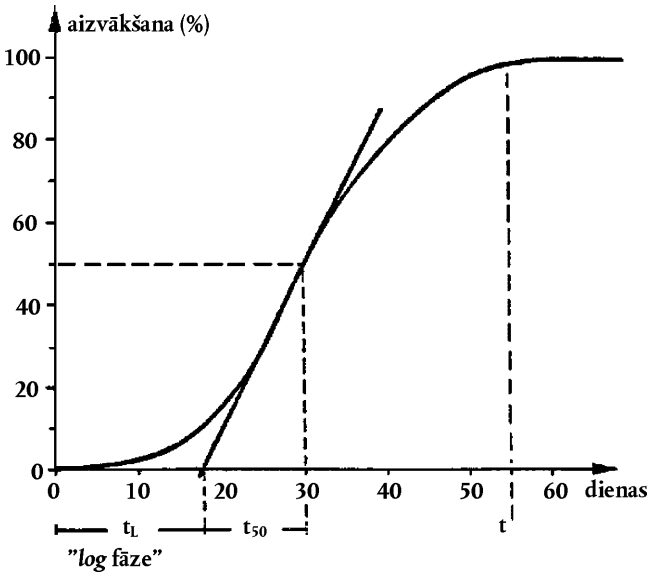
Rezultātu derīgums un interpretācija

34. Rezultātiem, kas iegūti ar standartvielām, piem., nātrija benzoātu, nātrija acetātu vai anilīnu, jābūt salīdzināmiem ar rezultātiem, kas iegūti starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3) (sk. nodaļas "Standartvielas" 7. punktu). Ja rezultāti, kas iegūti ar standartvielām, ir netipiski, tests jāatkārto, izmantojot citu jūras ūdens paraugu. Kaut arī inhibēšanas testu rezultāti var ne vienmēr būt viennozīmīgi interpretējami, jo *DOC* ietekmē arī testējamā viela, pozitīva zīme toksiskās ietekmes jomā ir kopējā *DOC* noārdīšanās ātruma būtisks samazinājums, salīdzinot ar kontrolgrupas rādītājiem.

35. Ņemot vērā izmantotās salīdzinoši augstās testa koncentrācijas, salīdzinājumā ar lielāko daļu dabisko sistēmu (un līdz ar to – nelabvēlīgo attiecību starp testējamo vielu un citu oglekļa avotu koncentrācijām), šī metode ir uzskatāma par provizorisku testu, ko var izmantot, lai noskaidrotu, vai vielai piemīt augsta bionoārdāmība. Tādējādi zemais rezultāts ne vienmēr nozīmē, ka testējamajai vielai nepiemīt bionoārdāmība jūras vidē, bet gan apliecina, ka ir nepieciešams papildu darbs, lai varētu to noskaidrot.

Turpmākais attēls parāda teorētiskās noārdīšanās eksperimenta piemēru, kas ilustrē iespējamo veidu, kā aplēst t_L vērtības ("adaptācijas fāzes" ilgumu) un t_{50} (laika intervālu, sākot no t_L), kas nepieciešams 50 % noārdīšanās sasniegšanai.

▼M6



SLĒGTĀS PUDELES METODE

IEVADS

1. Šī metode ir "slēgtās pudeles" testa (5) variants jūras ūdenim, kas tika izstrādāts starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātā, kuru Eiropas Komisijas (EK) uzdevumā organizēja Dānijas Ūdens kvalitātes institūts (3).

2. Tāpat kā saistītajā "kolbu kratīšanas" metodē ar jūras ūdeni šā testa rezultāti nav uzskatāmi par tūlītējas bionoārdāmības rādītājiem, bet ir jāizmanto tikai informācijas iegūšanai par vielu bionoārdāmību jūras vidē.

METODES PRINCIPS

3. Iepriekš noteiktu testējamās vielas daudzumu izšķīdina testēšanas barotnē, parasti koncentrācijā, kas atbilst 2–10 mg testējamās vielas uz litru (var izmantot vienu vai vairākas koncentrācijas). Šķīdumu uzglabā piepildītā noslēgtā pudelē tumsā un ūdens vannā vai telpā ar pastāvīgu temperatūru, ko kontrolē līdz ± 1 °C diapazonā 15–20 °C. Gadījumos, kad pētījuma mērķis ir modelēt vides situācijas, testus var veikt ārpus šā normālā temperatūras diapazona, nodrošinot piemērotus pielāgojumus attiecībā uz temperatūras kontroli. Pēc noārdīšanās tiek veikta skābekļa analīze par visu 28 dienu laikposmu.

4. Starplaboratoriju salīdzinošā testēšana pierādīja, ka, pagarinot testu pēc šīm 28 dienām, dažādu traucējumu dēļ lielākoties nav iespējams iegūt lietderīgu informāciju. Bioloģiskā skābekļa patēriņa *(BOD)* kontroltesta vērtības bija pārāk augstas, iespējams, tādēļ, ka nekustīguma dēļ paātrinājās baktēriju augšana un notika nitrifikācija. Tādēļ ieteicamais ilgums ir 28 dienas, bet, ja *BOD* kontroltesta vērtības saglabājas 30 procentu robežās (15. un 40. punkts), šo testu var pagarināt.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

5. Lai uzzinātu, vai konkrētai vielai var piemērot attiecīgo testu, ir jāzina vairākas tās īpašības. Nepieciešama empīriska formula, lai varētu aprēķināt teorētisko skābekļa patēriņu *(ThOD)* (sk. 3. papildinājumu); pretējā gadījumā ir jānosaka vielas ķīmiskais skābekļa patēriņš *(COD)*, lai to izmantotu kā standartvērtību. *COD* lietošana ir mazāk apmierinoša, jo dažas vielas *COD* testā pilnībā neoksidējas.

▼M6

6. Vielas šķīdībai ir jābūt vismaz 2 mg/l, tomēr principā mazāk šķīstošās vielas var testēt (piem., apstrādājot tās ar ultraskaņu), kā arī var testēt gaistošās vielas. Iegūto rezultātu interpretēšanai vajadzīga informācija par testējamās vielas tīrību vai galveno sastāvdaļu salīdzinošajām proporcijām, jo īpaši gadījumos, kad rezultāti ir tuvi "pieņemamam" līmenim.

7. Piemērotāko testa koncentrāciju izvēlei var ļoti noderēt informācija par vielas toksisko iedarbību uz baktērijām, piem., īstermiņa elpošanas testa (4) mērījumos, un tā var būt svarīga bionoārdāmības zemo vērtību pareizai interpretēšanai. Tomēr ne vienmēr ar šo informāciju pietiek, lai interpretētu bioloģiskās noārdīšanās testa rezultātus, un 27. punktā izklāstītā procedūra ir piemērotāka.

STANDARTVIELAS

8. Pārbaudot jūras ūdens parauga mikrobiālo aktivitāti, jāizmanto piemērotas standartvielas. Šim nolūkam var izmantot, piem., anilīnu, nātrija acetātu vai nātrija benzoātu. Šīm vielām ir jānoārdās vismaz par 60 procentiem (no to *ThOD*) pietiekami īsā laikā, pretējā gadījumā ir ieteicams atkārtot testu ar citu jūras ūdens paraugu.

9. EK starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, kurai jūras ūdens paraugi tika ņemti dažādās vietās un dažādos gada laikos, adaptācijas fāze (t_L) un laiks, kad jāsasniedz 50 % noārdīšanās (t_{50}), izņemot adaptācijas fāzi, ilga no 0 līdz 2 dienām un nātrija benzoātam – attiecīgi no 1 līdz 4 dienām. Anilīnam t_L un t_{50} vērtības bija attiecīgi no 0 līdz 7 un no 2 līdz 12 dienām.

ATKĀRTOJAMĪBA

10. Metodes atkārtojamība tika noteikta EK starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3).

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

11. Parastais laboratorijas aprīkojums un:

a) var izmantot 250–300 ml *BOD* pudeles ar stikla aizbāžņiem vai 250 ml pudeles ar šauru kaklu un stikla aizbāžņiem;

b) vairākas 2-, 3- un 4-litru pudeles ar litru atzīmēm eksperimenta sagatavošanai un *BOD* pudeļu piepildīšanai;

c) ūdens vanna vai istaba ar konstantu temperatūru pudeļu uzturēšanai nemainīgā temperatūrā (± 1 °C), nepieļaujot gaismas iedarbību;

d) izšķīdinātā skābekļa analīzes iekārtas;

e) membrānfiltri, 0,2–0,45 μm (pēc izvēles);

f) iekārtas izvēlētajai analīzei (pēc izvēles).

Jūras ūdens

12. Paņem jūras ūdens paraugu rūpīgi iztīrītā konteinerā, un nogādā to laboratorijā, vislabāk – vienas vai divu dienu laikā pēc parauga paņemšanas. Pārvadāšanas laikā parauga temperatūrai neļauj būtiski pārsniegt testa gaitā piemēroto temperatūru.

▼M6

13. Precīzi atzīmē parauga ņemšanas vietu, un raksturo tās piesārņotību un barības vielu daudzumu. Jo īpaši attiecībā uz piekrastes vai piesārņotiem ūdeņiem šajā raksturojumā iekļauj heterotrofo mikroorganismu koloniju skaitu un izšķīdušo nitrātu, amonjaka un fosfātu noteiktās koncentrācijas.

14. Par pašu jūras ūdens paraugu sniedz šādu informāciju:

— parauga ņemšanas datums;

— ņemšanas dziļums;

— parauga izskats – duļķains utt.;

— temperatūra parauga ņemšanas laikā;

— sāļums;

— izšķīdušais organiskais ogleklis *(DOC)*;

— laiks starp parauga paņemšanu un izmantošanu testā.

15. Ja parauga *DOC* saturs tiek atzīts par augstu vai šķiet, ka *BOD* kontroltests pēc 28 dienām uzrādīs vairāk nekā 30 % standartvielu *DOC*, ieteicams pirms lietošanas jūras ūdeni nostādināt aptuveni vienu nedēļu.

16. Paraugu nostādina, uzglabājot aerobos apstākļos testēšanas temperatūrā un tumsā vai izkliedētā gaismā. Ja nepieciešams, aerobos apstākļus uztur ar vieglu aerāciju. Nostādināšanas laikā samazinās viegli noārdāmā organiskā materiāla saturs. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3) netika konstatēta nekāda atšķirība starp nostādināta un svaigi paņemta jūras ūdens parauga noārdīšanās potenciālu.

17. Jūras ūdeni pirms lietošanas iepriekš apstrādā, lai aizvāktu rupjās daļiņas, piem., filtrējot caur neilona filtru vai raupja papīra filtru (nelieto membrānas vai *GFC* filtrus), vai sedimentējot un dekantējot. Par izmantoto procedūru ziņo. Pēc nostādināšanas, ja tā ir veikta, iepriekš apstrādā.

Minerālvielu izejšķīdumi

18. No analītiskas tīrības pakāpes reaģentiem pagatavo šādus izejšķīdumus.

a)	Kālija dihidrogēnortofosfāts, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikālija hidrogēnortofosfāts, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinātrija hidrogēnortofosfāta dihidrāts, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Amonija hlorīds, NH_4Cl	0,50 g
	Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram	
b)	Kalcija hlorīds, $CaCl_2$	27,50 g
	Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram	
c)	Magnija sulfāta heptahidrāts, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram	
d)	Dzelzs (III) hlorīda heksahidrāts, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Izšķīdina un papildina ar destilētu ūdeni līdz 1 litram	

▼M6

Nogulsnēšanos d) šķīdumā var novērst, pievienojot vienu pilienu koncentrēta HCl vai 0,4 g etilēnediaminetetra-etiķskābes (*EDTA*, dinātrija sāls) uz litru. Ja nogulsnes veidojas izejšķīdumā, to nomaina ar svaigi pagatavotu šķīdumu.

Testēšanas barotnes sagatavošana

19. Uz katru litru iepriekš apstrādāta jūras ūdens pielej 1 ml katra iepriekš minētā izejšķīduma. Testēšanas barotni piesātina ar gaisu testa temperatūrā, aerējot to ar tīru saspiestu gaisu aptuveni 20 minūtes. Kontroles nolūkā nosaka izšķīdinātā skābekļa koncentrāciju. Izšķīdinātā skābekļa piesātināto koncentrāciju kā sāļuma un temperatūras funkciju var nolasīt nomogrammā, kas pievienota šai testēšanas metodei (4. papildinājums).

Inokulāts

20. Nepievieno nekādu citu inokulātu papildus tiem mikroorganismiem, kas jau atrodas jūras ūdenī. (Pēc izvēles) nosaka kolonijas veidojošo heterotrofu skaitu jūras ūdens testēšanas barotnē (un vislabāk arī oriģinālajos jūras ūdens paraugos), piem., pēc dzīvotspējīgo mikroorganismu skaita, izmantojot jūras agaru. Tas ir īpaši vēlams paraugiem no piekrastes vai piesārņotām vietām. Pārbauda heterotrofo mikroorganismu aktivitāti jūras ūdenī, veicot testu ar standartvielu.

Testa pudeļu sagatavošana

21. Veic visas nepieciešamās darbības, tostarp jūras ūdens nostādināšanu un iepriekšēju apstrādi izvēlētajā testēšanas temperatūrā no 15 līdz 20 °C, nodrošinot visu stikla trauku tīrību, bet ne sterilitāti.

22. Vienlaicīgām eksperimentu sērijām sagatavo *BOD* pudeļu grupas, lai noteiktu testējamās vielas un standartvielas *BOD*. Katru analīzi veic divās pudelēs (tukšais tests, standartviela un testējamā viela), t. i., katrai noteikšanai sagatavo divas pudeles. Analīzes veic vismaz 0., 5., 15. un 28. dienā (četras noteikšanas). Skābekļa analīzēm, lai veiktu četras noteikšanas, pavisam ir vajadzīgas $3 \times 2 \times 4 = 24$ pudeles (tukšajam testam, standartvielai un testējamai vielai) un līdz ar to aptuveni astoņi litri testēšanas barotnes (vienai testējamās vielas koncentrācijai).

23. Testējamās vielas un standartvielas šķīdumus atsevišķi sagatavo lielās pudelēs ar pietiekamu tilpumu (11. punkts), šajās daļēji piepildītajās lielajās pudelēs vispirms ielejot testējamās un standartvielas tieši vai arī izmantojot koncentrētu izejšķīdumu. Pievieno papildu testēšanas barotni, lai iegūtu vēlamās galīgās koncentrācijas. Ja izmanto testējamo un/vai standartvielu izejšķīdumus, nodrošina, lai jūras ūdens barotnes sāļums būtiski nemainītos.

24. Izvēlās testējamo un standartvielu koncentrācijas, ņemot vērā:

a) izšķīdinātā skābekļa šķīdību jūras ūdenī testa pamata temperatūrā un sāļuma pamata līmenī (sk. pievienoto nomogrammu 4. papildinājumā);

b) jūras ūdens *BOD* kontroltestu un

c) paredzamo testējamās vielas bionoārdāmību.

▼M6

25. Izšķīdinātā skābekļa šķīdība 15 °C un 20 °C temperatūrā un ar sāļumu 32 daļas no tūkstoša (okeāna ūdenim) attiecīgi ir aptuveni 8,1 un 7,4 mg/l. Jūras ūdens skābekļa patēriņš (tukšā elpošana) var sasniegt 2 mg O_2/l vai vairāk, ja jūras ūdens netiek nostādināts. Tādējādi, lai nodrošinātu būtiskas skābekļa koncentrācijas saglabāšanos pēc testējamās vielas oksidācijas, kā testējamās vielas sākuma koncentrāciju izmanto aptuveni 2–3 mg/l (atkarībā no *ThOD*) vielām, kurām paredzams, ka testēšanas apstākļos tās pilnībā noārdīsies (piem., standartvielām). Mazāk noārdāmām vielām testu veic ar augstākām koncentrācijām, līdz aptuveni 10 mg/l, ja nerodas toksiska iedarbība. Labākus rezultātus var iegūt, paralēli veicot testus gan ar zemu (aptuveni 2 mg/l), gan augstu (aptuveni 10 mg/l) testējamās vielas koncentrāciju.

26. Skābekļa tukšais patēriņš jānosaka paralēli, izmantojot pudeles, kurās nav ne testējamās, ne standartvielas.

27. Ja ir jānosaka inhibēšanas ietekme, atsevišķās lielās pudelēs sagatavo turpmāk minētās šķīdumu sērijas (13. punkts):

a) 2 mg uz litru viegli noārdāmas vielas, piem., jebkuras minētās standartvielas;

b) x mg uz testējamās vielas litru (parasti x ir 2);

c) 2 mg uz litru viegli noārdāmas vielas, pieskaitot x mg uz testējamās vielas litru.

Fizikāli ķīmiskais kontroltests (pēc izvēles)

28. Ja izmanto iespēju veikt specifiskas analīzes, var veikt arī fizikāli ķīmisku eksperimentu, lai pārbaudītu, vai abiotiskie mehānismi, piem., hidrolīze vai adsorbcija, ir noārdījuši testējamo vielu. Fizikāli ķīmisko kontroltestu var veikt, pievienojot dzīvsudraba (II) hlorīdu ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) divās kolbās ar testējamo vielu, lai apturētu mikrobiālo aktivitāti. Būtisks konkrētās vielas koncentrācijas samazinājums testa gaitā liecina par abiotiskiem noārdīšanās mehānismiem.

***BOD* pudeļu skaits parastā sērijā**

29. Parastā sērijā izmanto šādas pudeles:

— vismaz astoņas ar testējamo vielu;

— vismaz astoņas, kurās ir tikai ar uzturvielām bagātināts jūras ūdens;

— vismaz astoņas ar standartvielu un, ja nepieciešams;

— sešas pudeles ar testējamo un standartvielu (toksicitātes kontrolei).

PROCEDŪRA

30. Pēc pagatavošanas uzreiz iepilda sifonā katru šķīdumu no attiecīgās lielās pudeles apakšējās ceturtdaļas (ne no pašas apakšas), lai piepildītu attiecīgo *BOD* pudeļu grupu. Nekavējoties analizē nulles kontroles datus (nulles laikā) izšķīdinātajam skābeklim (33. punkts) vai saglabā tos turpmākai ķīmiskai analīzei, veidojot nogulsnes ar $MnCl_2$ (mangāna (II) hlorīdu) un NaOH (nātrija hidroksīdu).

([1]) Dzīvsudraba(II) hlorīds ($HgCl_2$) ir ļoti toksiska viela, kas jāpārvieto ar pienācīgu piesardzību. Šķidrie atkritumi, kas satur šo ķīmisko vielu, atbilstoši jādeponē; tos nedrīkst izliet tieši kanalizācijas sistēmā.

▼M6

31. Inkubē pārējās paralēlās *BOD* pudeles testa temperatūrā (15–20 °C), tur tumsā un izņem no inkubācijas zonas attiecīgos laika intervālos (piem., vismaz pēc 5, 15 un 28 dienām), kā arī analizē attiecībā uz izšķīdināto skābekli (33. punkts).

32. Specifiskajai analīzei paredzētajiem paraugiem veic membrānfiltrēšanu (0,2–0,45 μm) vai centrifugēšanu 15 minūtes (pēc izvēles). Uzglabā līdz 48 stundām 2–4 °C temperatūrā vai ilgāku laiku –18 °C temperatūrā, ja analīzi neveic nekavējoties (ja ir zināms, ka testējamā viela netiks ietekmēta, pirms uzglabāšanas skābina līdz pH 2).

Izšķīdinātā skābekļa noteikšana

33. Nosaka izšķīdinātā skābekļa koncentrāciju, izmantojot ķīmisku vai elektroķīmisku metodi, kas atzīta valsts vai starptautiskā līmenī.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

34. Analīzes rezultātus reģistrē pievienotajās datu lapās (5. papildinājums).

35. *BOD* aprēķina kā skābekļa satura samazinājuma starpību starp skābekļa tukšo patēriņu un patēriņu testējamās vielas šķīdumu testēšanas apstākļos. Skābekļa satura neto samazinājumu izdala ar vielas koncentrāciju *(w/v)*, lai izteiktu *BOD* kā mg *BOD*/mg testējamās vielas. Noārdīšanos definē kā bioķīmiskā skābekļa patēriņa attiecību pret teorētisko skābekļa patēriņu *(ThOD)* (ieteicamākais variants) vai ķīmisko skābekļa patēriņu *(COD)*, un izsaka to procentos (sk. 36. punktu).

36. Bioloģiskās noārdīšanās vērtības aprēķina katram paraugu ņemšanas laikam gan testējamai, gan standartvielai, izmantojot vienu no šiem vienādojumiem:

$$\%\ biodegradācija = \frac{mg\ O_2/mg\ testējamās\ vielas}{mg\ ThOD/mg\ testējamās\ viela} \times 100$$

$$\%\ biodegradācija = \frac{mg\ O_2/mg\ testējamās\ vielas}{mg\ COD/mg\ testējamās\ vielas} \times 100$$

kur:

ThOD = teorētiskais skābekļa patēriņš (aprēķini, 3. papildinājums);

COD = ķīmiskais skābekļa patēriņš, kuru nosaka eksperimentāli.

Piezīme. Dažkārt šie abi aprēķināšanas veidi (kā procenti no *ThOD* vai kā procenti no *COD*) nesniedz vienādus rezultātus; pareizāk ir lietot *ThOD*, jo dažas vielas *COD* testā pilnībā neoksidējas.

37. Noārdīšanās testa gaitu grafiski ilustrē shēmā (sk. piemēru nodaļā "Rezultātu derīgums un interpretācija"). Ja datu pietiek, no bioloģiskās noārdīšanās līknes aprēķina adaptācijas fāzi (t_L) un laiku, kas nepieciešams, lai sasniegtu 50 % noārdīšanos, sākot no adaptācijas fāzes beigām (t_{50}).

38. Ja izmanto specifiskās analīzes (pēc izvēles), primārās noārdīšanās procentuālo īpatsvaru izsaka kā konkrētās vielas noārdīšanas procentuālo īpatsvaru testa periodā (ar analītisko kontroļu korekciju).

▼M6

Testēšanas pārskats

39. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības;

— identifikācijas dati.

Testēšanas apstākļi:

— paraugu ņemšanas vietas novietojums un apraksts – piesārņojuma un uzturvielu daudzums (koloniju skaits, nitrāti, amonjaks un fosfāti, ja attiecināms);

— parauga īpašības (paņemšanas datums, dziļums, izskats, temperatūra, sāļums, *DOC* (pēc izvēles), laiks starp parauga paņemšanu un izmantošanu testā;

— izmantotā metode (ja ir) jūras ūdens nostādināšanai;

— izmantotā metode jūras ūdens iepriekšējai apstrādei (filtrēšana/sedimentācija);

— izmantotā metode *COD* noteikšanai (ja to veic);

— izmantotā metode skābekļa mērījumiem;

— izšķīdināšanas procedūra vielām, kas slikti šķīst testēšanas apstākļos;

— izmantotā metode heterotrofu skaita noteikšanai jūras ūdenī (dzīvotspējīgo mikroorganismu skaita metode vai cita procedūra);

— izmantotā metode *DOC* noteikšanai jūras ūdenī (pēc izvēles);

— izmantotā metode specifiskajām analīzēm (pēc izvēles);

— citas izvēles metodes, ko izmanto jūras ūdens raksturošanai (*ATP* mērījumi utt.).

Rezultāti:

— analīzes dati ir paziņoti datu lapā (pievienota 5. papildinājumā);

— noārdīšanās testa gaita ir grafiski attēlota shēmā, kas parāda adaptācijas fāzi (t_L), tendenci un laiku (sākot no adaptācijas fāzes beigām), kas nepieciešams testējamās vielas oksidācijas izraisītās skābekļa galīgās uzņemšanas sasniegšanai par 50 procentiem (t_{50}). Adaptācijas fāzi var aplēst grafiski, kā parādīts pievienotajā attēlā, vai arī ērti pieņemt kā laiku, kas nepieciešams, lai noārdītos par 10 procentiem;

— procentuālā noārdīšanās, kas izmērīta pēc 28 dienām.

Rezultātu apspriešana.

Rezultātu derīgums un interpretācija

40. Tukšā elpošana nedrīkst pārsniegt 30 procentus skābekļa testa pudelē. Ja šo kritēriju nav iespējams izpildīt ar svaigi paņemtu jūras ūdeni, tas pirms lietošanas ir jānostādina (jāstabilizē).

41. Jāņem vērā iespēja, ka rezultātus var ietekmēt slāpekli saturošas vielas.

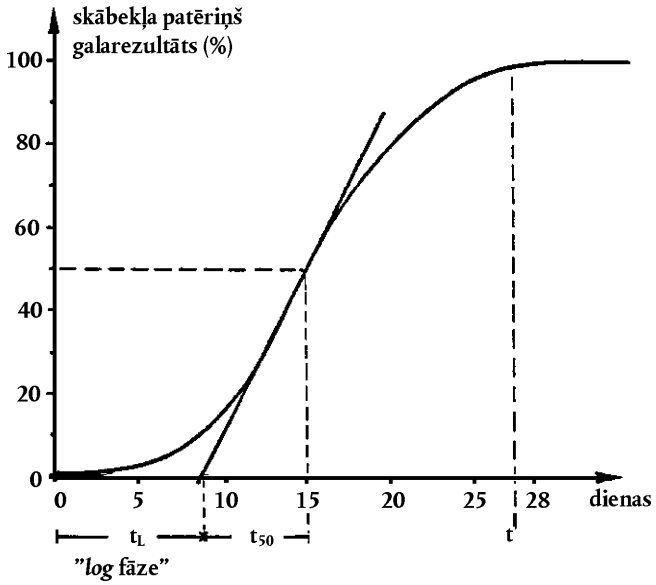
▼M6

42. Rezultātiem, kas iegūti ar standartvielām nātrija benzoātu un anilīnu, jābūt salīdzināmiem ar starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (3) iegūtajiem rezultātiem (9. punkts). Ja rezultāti, kas iegūti ar standartvielām, ir netipiski, tests jāatkārto, izmantojot citu jūras ūdens paraugu.

43. Testējamo vielu var atzīt par baktēriju darbību kavējošu (izmantotajā koncentrācijā), ja standartvielas un testējamās vielas maisījuma *BOD* ir mazāks nekā šo abu vielu atsevišķo šķīdumu *BOD* summa.

44. Ņemot vērā salīdzinoši augstās testa koncentrācijas salīdzinājumā ar lielāko daļu dabisko sistēmu un līdz ar to – nelabvēlīgo attiecību starp testējamās vielas un citu oglekļa avotu koncentrācijām–, šī metode ir uzskatāma par provizorisku testu, ko var izmantot, lai noskaidrotu, vai vielai piemīt augsta bionoārdāmība. Tādējādi zemais rezultāts ne vienmēr nozīmē, ka testējamā viela nav bionoārdāma jūras vidē, bet gan apliecina, ka ir nepieciešams papildu darbs, lai varētu to noskaidrot.

Turpmākais attēls parāda teorētiskās noārdīšanās eksperimenta piemēru, kas ilustrē iespējamo veidu, kā aplēst t_L vērtības ("adaptācijas fāzes" ilgumu) un t_{50}, laika intervālu (sākot no t_L), kas nepieciešams testējamās vielas oksidācijas izraisītās skābekļa galīgās uzņemšanas sasniegšanai par 50 procentiem.



LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.4-B. nodaļa: Tūlītējas bionoārdāmības noteikšana; III daļa: Modificēts ESAO skrīninga tests.

(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) Šā pielikuma C.11. nodaļa: Bionoārdīšanās: aktivēto dūņu elpošanas inhibēšanas tests.

(5) Šā pielikuma C.4-E. nodaļa: Tūlītējas bionoārdāmības noteikšana; VI daļa: Slēgtās pudeles tests.

▼M6

1. papildinājums

Organiskā oglekļa noteikšana jūras ūdenī

KOLBU KRATĪŠANAS METODE

Lai noteiktu organisko oglekli ūdens paraugā, šā parauga organiskos savienojumus oksidē par oglekļa dioksīdu, parasti izmantojot vienu no trim šādām metodēm:

— mitrā oksidācija ar persulfātu/UV starojumu;

— mitrā oksidācija ar persulfātu/paaugstinātu temperatūru (116–130 °C);

— dedzināšana.

Radušos CO_2 izsaka kvantitatīvi, izmantojot infrasarkano spektrometriju vai titrimetriju. Cits paņēmiens ir CO_2 reducēšana par metānu, ko izsaka kvantitatīvi ar liesmas jonizācijas detektoru *(FID)*.

Persulfāta/UV metodi plaši izmanto, analizējot "tīru" ūdeni ar zemu cieto daļiņu saturu. Abas pēdējās metodes var izmantot lielākajai daļai ūdens paraugu veidu, un persulfāta/paaugstinātās temperatūras-oksidācijas metode ir piemērotāka zema līmeņa paraugiem, bet dedzināšanas metodi izmanto paraugiem ar negaistošu organiskā oglekļa *(NVOC)* saturu, kas būtiski pārsniedz 1 mg C/l.

Traucējumi

Visas trīs metodes ir atkarīgas no paraugā esošā neorganiskā oglekļa *(IC)* izvadīšanas vai kompensēšanas. Skābināta parauga attīrīšana no CO_2 ir visbiežāk izmantotā metode *IC* izvadīšanai, lai gan tā izraisa arī gaistošo organisko savienojumu zudumus (1). Pilnīga *IC* eliminācija vai kompensēšana ir jānodrošina katrai parauga matricai, bet gaistošais organiskais ogleklis *(VOC)* ir jānosaka papildus *NVOC*, atkarībā no parauga veida.

Augstas hlorīda koncentrācijas samazina oksidācijas efektivitāti, izmantojot persulfāta/UV metodi (2). Tomēr šos traucējumus var novērst, izmantojot oksidācijas reaģentu, kas mainīts, pievienojot tam dzīvsudraba (II) nitrātu. Novērtējot katru parauga veidu, kas satur hlorīdu, ieteicams lietot maksimāli pieļaujamo parauga tilpumu. Ja ar dedzināšanas metodi analizētajā paraugā ir augsta sāls koncentrācija, sāls var pārklāt katalizatoru un izraisīt pārmērīgu dedzināšanā izmantotās mēģenes koroziju. Jāveic piesardzības pasākumi, kas paredzēti ražotāja rokasgrāmatā.

Izteikti duļķaini paraugi, kā arī paraugi, kas satur cietas daļiņas, var oksidēties nepilnīgi, izmantojot persulfāta/UV metodi.

Piemērotas metodes piemērs

Negaistošo organisko oglekli nosaka oksidācijā ar persulfātu/UV starojumu, un radušos CO_2 pēc tam izsaka kvantitatīvi, izmantojot nedispersīvo infrasarkano spektrometriju.

Oksidācijas reaģentu maina saskaņā ar apsvērumiem, kas minēti (2), kā arī izklāstīti ražotāja rokasgrāmatā.

a) 8,2 g $HgCl_2$ un 9,6 g $Hg(NO_3)_2$. H_2O izšķīdina vairākos simtos mililitru zemas oglekļa koncentrācijas reaģenta ūdens.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ izšķīdina dzīvsudraba sāls šķīdumā.

▼**M6**

c) Maisījumam pievieno 5 ml HNO_3 (konc.).

d) Reaģentu atšķaida līdz 1 000 ml.

Hlorīda radītos traucējumus novērš, izmantojot 40 µl parauga tilpuma 10 procentiem hlorīda un 200 µl parauga tilpuma 1,9 procentiem hlorīda. Saskaņā ar šo metodi var analizēt paraugus ar augstām hlorīda koncentrācijām un/vai lielākiem parauga tilpumiem, ja tiek novērsta hlorīda veidošanās oksidācijas traukā. Pēc tam attiecīgajam parauga veidam var veikt gaistošā organiskā oglekļa noteikšanu, ja nepieciešams.

LITERATŪRA

(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.

Var noderēt arī (raksturo pašanalīzes sistēmu):

(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. papildinājums

Bionoārdīšanās jūras ūdenī

KOLBU KRATĪŠANAS METODE

DATU LAPA

1. **LABORATORIJA:**

2. **TESTA SĀKUMA DATUMS:**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA:**

Nosaukums:

Izejšķīduma koncentrācija:	mg/l kā viela
Sākotnējā koncentrācija testēšanas barotnē, t_o:	mg/l kā viela
:	mg *DOC/l*

4. **JŪRAS ŪDENS:**

Avots:

Parauga ņemšanas datums:

Parauga ņemšanas dziļums:

Izskats parauga ņemšanas laikā (piem., duļķains utt.):

Sāļums parauga ņemšanas laikā:	‰
Temperatūra parauga ņemšanas laikā:	°C
DOC "x" stundas pēc parauga paņemšanas:	mg/l

Iepriekšēja apstrāde pirms testēšanas (piem., filtrēšana, sedimentācija, nostādināšana utt.):

Mikroorganismu koloniju skaits	— oriģinālais paraugs:	kolonijas/ml
	— testa sākumā:	kolonijas/ml

Citas īpašības:

5. **OGLEKĻA NOTEIKŠANA**

Oglekļa analizators:

	Kolba Nr.		*DOC* pēc n dienām (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Tests: ar uzturvielām bagātināts jūras ūdens ar testējamo vielu	1	a_1					
		a_2					
		vidēji, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		vidēji, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Kolba Nr.		*DOC* pēc n dienām (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Tukšais tests: ar uzturvielām bagātināts jūras ūdens bez testējamās vielas	1	c_1					
		c_2					
		vidēji, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		vidēji, $C_{d(t)}$					
	vidēji, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **JĒLDATU NOVĒRTĒJUMS**

Kolba Nr.	Rezultātu aprēķināšana	% noārdīšanās pēc n dienām				
		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				
Vidēji (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D_1 un D_2 nedrīkst rēķināt vidējo lielumu, ja pastāv ievērojama atšķirība.

Piezīme. Līdzīgus formātus var izmantot, ja pēc noārdīšanās veic specifiskas analīzes, ka arī attiecībā uz standartvielu testēšanu un toksicitātes kontroles pasākumiem.

7. **ABIOTISKĀ NOĀRDĪŠANĀS (pēc izvēles)**

	Laiks (dienas)	
	0	t
DOC konc. (mg/l) sterilā kontrolē	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotiskā noārdīšanās} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

3. papildinājums

Teorētiskā skābekļa patēriņa aprēķināšana

SLĒGTĀS PUDELES METODE

ThOD vielai $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ ar molekulāro svaru (*MW*) aprēķina saskaņā ar:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

No šā aprēķina izriet, ka C ir mineralizēts par CO_2, H – par H_2O, P – par P_2O_5 un Na – par Na_2O. Halogēns ir izvadīts kā ūdeņraža halogenīds un slāpeklis kā amonjaks.

Piemērs:

glikoze $C_6H_{12}O_6$, *MW* = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 mg\ O_2/mg\ glikozes$$

Molekulāro svaru sāļiem, izņemot sārmu metālu sāļus, aprēķina, pieņemot, ka šie sāļi ir hidrolizēti.

Pieņem, ka sērs ir oksidēts līdz + 6 stāvoklim.

Piemērs:

nātrija n-dodekilbenzolsulfonāts $C_{18}H_{29}SO_3Na$, *MW* = 348.

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 mg\ O_2/mg\ vielas$$

Vielām, kas satur slāpekli, šo slāpekli var izvadīt kā amonjaku, nitrītu vai nitrātu atbilstoši atšķirīgajiem teorētiskajiem skābekļa patēriņiem.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

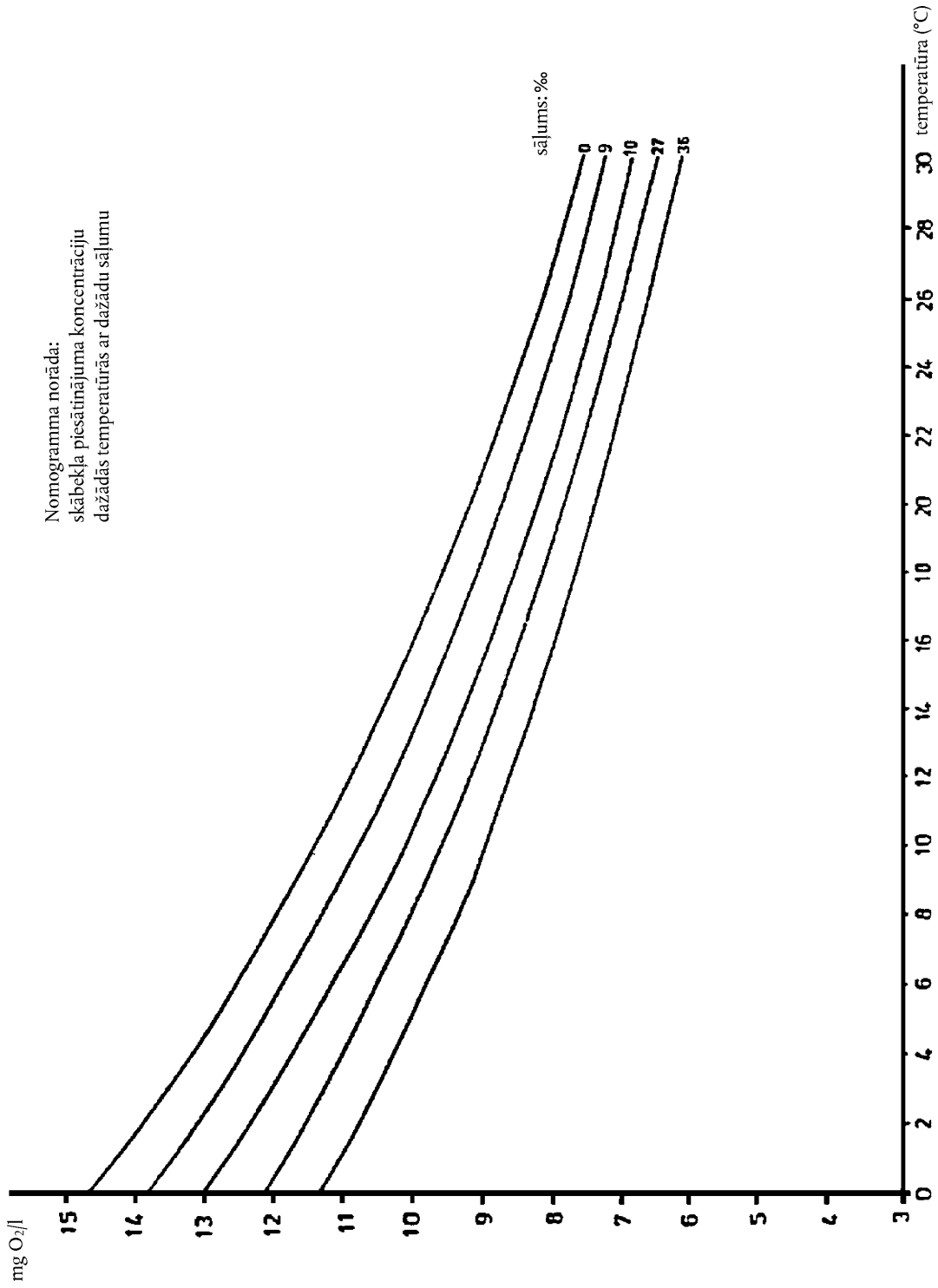
Uzskata, ka pilnīga nitrāta izveidošanās ir novērota, analizējot sekundāro amīnu:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, *MW* = 353.

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 mg\ O_2/mg\ vielas$$

▼**M6**

4. papildinājums



▼M6

5. papildinājums

Bionoārdīšanās jūras ūdenī

SLĒGTĀS PUDELES METODE

DATU LAPA

1. **LABORATORIJA:**

2. **TESTA SĀKUMA DATUMS:**

3. **TESTĒJAMĀ VIELA:**

Nosaukums:

Izejšķīduma koncentrācija:	mg/l
Sākotnējā konc. jūras ūdens barotnē:	mg/l
ThOD vai *COD*:	mg O_2/mg testējamās vielas

4. **JŪRAS ŪDENS:**

Avots:

Parauga ņemšanas datums:

Parauga ņemšanas dziļums:

Izskats parauga ņemšanas laikā (piem., duļķains utt.):

Sāļums parauga ņemšanas laikā:	‰
Temperatūra parauga ņemšanas laikā:	°C
DOC "x" stundas pēc parauga paņemšanas:	mg/l

Iepriekšēja apstrāde pirms testēšanas (piem., filtrēšana, sedimentācija, nostādināšana utt.):

Mikroorganismu koloniju skaits	— oriģinālais paraugs:	kolonijas/ml
	— testa sākumā:	kolonijas/ml

Citas īpašības:

5. **TESTĒŠANAS BAROTNE**

Temperatūra pēc aerācijas:	°C
O_2 koncentrācija pēc aerācijas un stāvoklis pirms testa sākuma:	mg O_2/l

6. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA (*DO*) NOTEIKŠANA**

Metode – Vinklera/elektroda metode

	Kolba Nr.		mg O_2/l pēc n dienām			
			0	5	15	28
Tests: ar uzturvielām bagātināts jūras ūdens ar testējamo vielu	1	a_1				
	2	a_2				
	Vidēji testā	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Kolba Nr.		mg O_2/l pēc n dienām			
			0	5	15	28
Tukšais tests: ar uzturvielām bagātināts jūras ūdens bez testējamās vielas	1	c_1				
	2	c_2				
	Vidēji tukšais	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Piezīme. Līdzīgu formātu var izmantot standartvielas testēšanai un toksicitātes kontroles pasākumiem.

7. **IZŠĶĪDUŠĀ SKĀBEKĻA SATURA SAMAZINĀŠANĀS – PROCENTUĀLĀ NOĀRDĪŠANĀS (%)**

	Izšķīdušā skābekļa satura samazināšanās pēc n dienām		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\% D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{testējamā\ viela(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Pieņemot, ka $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, kur
$m_{b(o)}$ = tukšā vērtība 0. dienā;
$m_{t(o)}$ = testējamās vielas vērtība 0. dienā.
Ja $m_{b(o)}$ nav vienāds ar $m_{t(o)}$, lieto $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, kur
$m_{b(x)}$ = tukšā vērtība x dienā;
$m_{t(x)}$ = testējamās vielas vērtība x dienā.

▼M6

C.43. **ORGANISKO VIELU ANAEROBĀ BIONOĀRDĀMĪBA PĀRSTRĀDĀTĀS DŪŅĀS: SARAŽOTĀS GĀZES MĒRĪŠANA**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 311 (2006. gads). Ir daudzi skrīninga testi organisko vielu aerobās bionoārdāmības novērtēšanai (testēšanas metodes C.4, C.9, C.10 un C.11 (1) un ESAO *TG* 302C (2)), un to piemērošanas rezultāti tiek sekmīgi izmantoti, prognozējot vielu apriti aerobā vidē, jo īpaši notekūdeņu attīrīšanas aerobajos posmos. Aerobā veidā testē arī ūdenī nešķīstošo vielu dažādas proporcijas, arī tām vielām, kas adsorbē uz notekūdeņos esošajām daļiņām, jo tās ir atrodamas nostādinātos notekūdeņos. Tomēr šo vielu lielākās frakcijas ir piesaistītas primāri nostādinātajām notekūdeņu dūņām, kas tiek atdalītas no nepārstrādātajiem notekūdeņiem nostādināšanas tvertnēs, pirms nostādinātie vai virspusē uzkrātie notekūdeņi tiek attīrīti aerobi. Pēc tam dūņas, kuru intersticiālais šķidrums satur vairākas šķīstošas vielas, tiek novadītas uz apsildāmiem bioreaktoriem anaerobai apstrādei. Tā kā šajās sērijās vēl nav testu anaerobās bionoārdāmības novērtēšanai anaerobajos bioreaktoros, šā testa uzdevums ir aizpildīt minēto trūkumu; tas ne vienmēr ir piemērojams citiem anoksiskās vides nodalījumiem.

2. Anaerobās bionoārdāmības novērtēšanai sekmīgi ir izmantotas respirometriskās metodes, ar ko mēra saražotās gāzes apjomus, galvenokārt metānam (CH_4) un oglekļa dioksīdam (CO_2), anaerobos apstākļos. *Birch et al.* (3) apskatīja šīs procedūras un secināja, ka visaptverošākais ir bijis Šeltona un Tīdjē (4) darbs, pamatojoties uz iepriekšējiem pētījumiem (5)(6)(7). Šī metode (4), ko turpmāk attīstīja citi (8) un kas kļuvusi par ASV standartu (9)(10), neatrisināja problēmas, ko rada CO_2 un CH_4 atšķirīgā šķīdība testēšanas barotnē un aprēķini par teorētisko gāzes ražošanu no testējamās vielas. *ECETOC* ziņojums (3) ieteica papildu mērījumus izšķīdinātā neorganiskā oglekļa *(DIC)* saturam centrifugāta šķidrumā, un tas ļāva šo metodi izmantot plašāk. *ECETOC* metode tika vērtēta starptautiskā kalibrēšanas pasākumā (jeb starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā) un kļuva par ISO standartu – ISO 11734 (11).

3. Šī testēšanas metode, kuras pamatā ir ISO 11734 (11), raksturo skrīninga metodi organisko vielu potenciālās anaerobās bionoārdāmības novērtēšanai konkrētos apstākļos (t. i., anaerobā kamerā konkrētā laikposmā un mikroorganismu koncentrāciju diapazonā). Tā kā atšķaidītās dūņas lieto ar salīdzinoši augstu testējamās vielas koncentrāciju un testēšanas ilgums parasti pārsniedz normālo uzglabāšanas laiku anaerobajos bioreaktoros, testēšanas apstākļi ne vienmēr atbilst apstākļiem anaerobajos bioreaktoros un tās neizmanto organisko vielu anaerobās bionoārdāmības novērtēšanai citos vides apstākļos. Dūņas tiek eksponētas testējamajai vielai līdz pat 60 dienām, un tas ir ilgāk par parasto dūņu uzglabāšanas laiku (25–30 dienas) anaerobajos bioreaktoros, taču rūpnieciskajās ražotnēs uzglabāšanas laiks var būt daudz ilgāks. Šā testa rezultātu prognozes nevar būt tik pārliecinošas kā aerobās bioloģiskās noārdīšanās gadījumā, jo pierādījumi, kas uzkrāti par testējamo vielu uzvedību "gatavos" aerobos testos, modelēšanas testos un aerobā vidē,

▼M6

ir pietiekami, lai pārliecinātos par to saistību; par anaerobo vidi nav pieejams daudz līdzīgu pierādījumu. Var pieņemt, ka pilnīga anaerobā bionoārdīšanās ir notikusi, sasniedzot 75–80 % teorētiskā gāzes ražošanas līmeņa. Augstā vielas attiecība pret biomasu, ko izmanto šajos testos, liecina, ka viela, kas tiek izvadīta, visticamāk tiks noārdīta anaerobajā bioreaktorā. Turklāt vielas, kas netiek pārveidotas gāzē testa laikā, ne vienmēr saglabāsies, kad vielas un biomasas attiecības būs vairāk videi atbilstošas. Tāpat, notiek arī citas anaerobas reakcijas, kurās vielas var noārdīties vismaz daļēji, piem., dehlorinācija, bet šis tests nekonstatē minētās reakcijas. Tomēr vielas izzušanu var novērot, izmantojot īpašas analītiskās metodes testējamās vielas noteikšanai (sk. 6., 30., 44. un 53. punktu).

TESTA PRINCIPS

4. Mazgātas pārstrādātas dūņas ([1]), kas satur zemu (<10 mg/l) neorganiskā oglekļa *(IC)* koncentrāciju, atšķaida aptuveni desmit reizes, lai kopējā cietvielu koncentrācija sasniegtu no 1 g/l līdz 3 g/l, un inkubē 35 °C ± 2 °C temperatūrā hermētiskos traukos ar testējamo vielu no 20 līdz 100 mg C/l līdz 60 dienām. Atļauts mērīt dūņu aktivitāti, paralēli veicot kontroltestu ar dūņu inokulātu testēšanas barotnē, bet bez testējamās vielas.

5. Izmēra augšgala spiediena palielinājumu traukos, ko izraisa oglekļa dioksīda un metāna ražošana. Liela daļa saražotā CO_2 testēšanas apstākļos tiks izšķīdināta šķidrajā posmā vai pārveidota par karbonātu vai hidrogēnkarbonātu. Šo neorganisko oglekli mēra testa beigās.

6. Oglekļa apjomu (neorganisko oglekli un metānu), ko rada testējamās vielas bionoārdīšanās, aprēķina no saražotās gāzes neto apjoma un no neto izveidotā *IC* šķidrajā posmā, kas pārsniedz tukšās kontrolvērtības. Bioloģiskās noārdīšanās pakāpi aprēķina, pamatojoties uz kopējo saražoto *IC* un metānu-C, izsakot to kā izmērītā vai aprēķinātā oglekļa, kas pievienots kā testējamā viela, apjoma īpatsvaru procentos. Bioloģiskās noārdīšanās gaitu var uzraudzīt, tikai veicot saražotās gāzes starpposma mērījumus. Turklāt primāro bioloģisko noārdīšanos var noteikt īpašajā analīzē testa sākumā un beigās.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

7. Lai varētu pareizi interpretēt iegūtos rezultātus, ir jāzina testējamās vielas tīrība, šķīdība ūdenī, gaistamības un adsorbcijas īpašības. Organiskā oglekļa saturs (% *w/w*) testējamā vielā ir jāuzzina, pamatojoties uz tās ķīmisko struktūru vai mērījumiem. Gaistošām testējamajām vielām lēmuma pieņemšanu par to, vai tests ir atbilstošs, atvieglo izmērītā vai aprēķinātā Henrija likuma konstante. Informācija par testējamās vielas toksicitāti anaerobām baktērijām ir noderīga, izvēloties atbilstošo testa koncentrāciju un interpretējot rezultātus, kas liecina par nepietiekamu bionoārdāmību. Ieteicams paredzēt kavēšanās kontroli, ja vien nav zināms, ka testējamā viela nekavē anaerobo mikroorganismu aktivitāti (sk. 21. punktu un ISO 13641–1 (12)).

([1]) Pārstrādātās dūņas ir maisījums, ko veido nostādinātās notekūdeņu daļas un aktivētās dūņas, kas inkubētas anaerobā bioreaktorā aptuveni 35 °C temperatūrā, lai mazinātu biomasas un aromāta problēmas un uzlabotu šo nogulšņu dehidrēšanas iespējas. Tās sastāv no anaerobo fermentatīvo un metāna baktēriju asociācijas, kas ražo oglekļa dioksīdu un metānu (11).

▼**M6**

TESTĒŠANAS METODES IZMANTOJAMĪBA

8. Šo testēšanas metodi var piemērot ūdenī šķīstošām vielām; to var piemērot arī nepietiekami šķīstošām un nešķīstošām vielām, ja izmanto precīzas dozēšanas metodi, piem., sk. ISO 10634 (13). Gaistošām vielām parasti ir nepieciešams atsevišķs lēmums katrā gadījumā. Var būt jāveic īpaši pasākumi, piem., lai testa laikā neizdalītos gāze.

STANDARTVIELAS

9. Lai pārbaudītu procedūru, standartvielu testē, izvēloties atbilstošus traukus, vienlaikus arī kā parastās testa gaitas daļu. Kā piemēri jāmin fenols, nātrija benzoāts un polietilēnglikols 400, un paredzams, ka tie noārdīsies par vairāk nekā 60 % teorētiski saražotās gāzes (t. i., metāna un neorganiskā oglekļa) 60 dienu laikā (3)(14).

TESTA REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

10. Starptautiskajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (14) gāzes spiediena mērījumi bija pietiekami atkārtojami starp trim vienādiem traukiem. Relatīvā standartnovirze (variācijas koeficients, *COV*) lielākoties bija zemāka par 20 %, kaut arī šī vērtība bieži palielinājās līdz > 20 % toksisko vielu klātbūtnē vai kad tuvojās 60 dienu inkubācijas perioda beigas. Lielākas novirzes tika konstatētas arī traukos, kuru tilpums bija < 150 ml. Testēšanas barotnes galīgās pH vērtības bija diapazonā 6,5–7,0.

11. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā tika iegūti turpmāk minētie rezultāti.

Testējamā viela	Kopējie dati n_1	Vidējā noārdīšanās (no kopējiem datiem) (%)	Relatīvā standartnovirze (no kopējiem datiem) (%)	Derīgie dati n_2	Vidējā noārdīšanās (no derīgajiem datiem) (%)	Relatīvā standartnovirze (no derīgajiem datiem) (%)	Dati > 60 % Noārdīšanās derīgajos testos n_3
Palmitīnskābe	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilēn Glikols 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporcija no n_2.

12. Visu ar palmitīnskābi un polietilēnglikolu 400 iegūto vidējo vērtību variācijas koeficienti bija attiecīgi 45 % (n = 36) un 35 % (n = 38). Izlaižot vērtības, kas bija < 40 % un > 100 % (pieņem, ka pirmajiem iemesls bija nepietiekami optimāli apstākļi, bet otrajiem – nezināmi cēloņi), *COV* samazinājās attiecīgi līdz 26 % un 23 %. "Derīgo" vērtību, kas sasniedza vismaz 60 % noārdīšanās pakāpi, proporcija bija 70 % palmitīnskābei un 83 % polietilēnglikolam 400. Procentuālās bioloģiskās noārdīšanās proporcijas, kas tika atvasinātas no *DIC* mērījumiem, bija salīdzinoši mazas, taču mainīgas. Palmitīnskābei šis intervāls bija 0–35 %, vidēji 12 %, ar *COV* 92 %, bet polietilēnglikolam 400 tas bija 0–40 %, vidēji 24 %, ar *COV* 54 %.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Aprīkojums

13. Nepieciešamas parastās laboratorijas iekārtas un turpmāk minētais:

a. inkubators – aizsargāts pret dzirkstelēm un kontrolēts pie 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. spiedienizturīga stikla testēšanas trauki atbilstošā nominālllielumā ([1]), visi aprīkoti ar gāzes necaurlaidīgu aizbāzni, kas spēj izturēt aptuveni 2 bārus. Augšgala tilpumam jābūt aptuveni 10–30 % no kopējā tilpuma. Ja biogāzi izdala regulāri, piemērots ir aptuveni 10 % augšgala tilpums, bet, ja gāzi izdala tikai testa beigās, piemēroti ir 30 %. Ja spiedienu izlaiž katrā parauga ņemšanas reizē, ieteicamas ir stikla seruma pudeles ar nominālo tilpumu 125 ml, kopējo tilpumu aptuveni 160 ml, noslēgtas ar seruma aizbāžņiem ([2]) un gofrētiem alumīnija gredzeniem;

c. spiediena mērierīce ([3]), kas pielāgota saražotās gāzes mērīšanai un izplūdei, piem., ar roku turams precīza spiediena mērītājs, kas pieslēgts piemērotai šļirces adatai; trīsvirzienu gāzes necaurlaidīgs vārsts atvieglo liekā spiediena atbrīvošanu (1. papildinājums). Nepieciešams saglabāt iespējami mazu iekšējo tilpumu spiediena devēja caurulēm un vārstam, lai kļūdas, ko izraisīs iekārtas tilpuma neievērošana, nebūtu būtiskas;

Piezīme. Spiediena rādījumus tiešā veidā izmanto, aprēķinot augšgalā saražotā oglekļa apjomu (42.–44. punkts). Spiediena rādījumus var arī pārveidot par saražotās gāzes tilpumu (35 °C temperatūrā, ar atmosfēras spiedienu), izmantojot konversijas grafiku. Šis grafiks ir izstrādāts, pamatojoties uz datiem, kas iegūti, ievadot zināmus slāpekļa gāzes tilpumus vairākos testēšanas traukos (piem., seruma pudelēs) 35° +/– 2 °C temperatūrā un reģistrējot iegūtos stabilizētā spiediena rādījumus (sk. 2. papildinājumu). Šie aprēķini ir izklāstīti 44. punkta piezīmē.

Brīdinājums. Centieties izvairīties no adatas dūriena traumām, lietojot mikrošļirces.

d. oglekļa analizators, kas piemērots neorganiskā oglekļa tiešai noteikšanai diapazonā 1 mg/l–200 mg/l;

e. šļirces ar augstu precizitātes pakāpi gāzveida un šķidrajiem paraugiem;

f. magnētiskie maisītāji un dzenmehānismi (pēc izvēles);

g. cimdu kaste (ieteicama).

Reaģenti

14. Visā testēšanā jāizmanto analītiskas tīrības pakāpes reaģenti.

([1]) Ieteicamais izmērs ir 0,1–1 litrs.

([2]) Ieteicams lietot gāzes necaurlaidīgus silikona aizbāžņus. Ieteicams arī pārbaudīt vāciņu, jo īpaši butilgumijas aizbāžņu, gāzes necaurlaidību, jo vairāki tirdzniecībā pieejamie aizbāžņi nav pietiekami hermētiski pret metānu un daži aizbāžņi nesaglabā hermētiskumu, kad testa apstākļos tos caurdur ar adatu.

([3]) Iekārta regulāri jālieto un jākalibrē, pildot ražotāja norādījumus. Ja izmanto paredzētās kvalitātes spiediena mērītāju, piemēram, kapsulā ar tērauda membrānu, laboratorijā nav jāveic nekāda kalibrēšana. Kalibrēšanas precizitāti var pārbaudīt laboratorijā, veicot viena punkta mērījumu ar 1×10^5 Pa, salīdzinot ar spiediena mērītāju ar mehānisko displeju. Ja šis punkts būs izmērīts pareizi, nemainīsies arī linearitāte. Ja izmanto citas mērierīces (bez ražotāja sertificētas kalibrācijas), ieteicams regulāri veikt kalibrēšanu visā diapazonā.

▼M6

Ūdens

15. Destilēts vai dejonizēts ūdens (atbrīvots no skābekļa, apsmidzinot ar slāpekļa gāzi, kas satur mazāk par 5 µl/l skābekļa), kas satur mazāk par 2 mg/l izšķīdināta organiskā oglekļa *(DOC)*.

Testēšanas barotne

16. Sagatavo izšķīdināšanas barotni, kas satur turpmāk minētās sastāvdaļas norādītajos apjomos.

Bezūdens kālija dihidrogēnfosfāts (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinātrija hidrogēnfosfāta dodekahidrāts ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Amonija hlorīds (NH_4Cl)	0,53 g
Kalcija hlorīda dihidrāts ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnija hlorīda heksahidrāts ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Dzelzs (II) hlorīda tetrahidrāts ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurīns (skābekļa rādītājs)	0,001 g
Nātrija sulfīda nonahidrāts ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Mikroelementu izejšķīdums (pēc izvēles, 18. punkts)	10 ml
Pievieno no skābekļa atbrīvotu ūdeni (15. punkts)	līdz 1 litram

Piezīme. Lai nodrošinātu pietiekamu redukcijas spēju, jālieto svaigi piegādāts nātrija sulfīds, vai arī tas pirms lietošanas jāmazgā un jāžāvē. Šo testu var veikt, neizmantojot cimdu kasti (sk. 26. punktu). Šādā gadījumā nātrija sulfīda galīgā koncentrācija barotnē jāpaaugstina līdz 0,20 g $Na_2S \times 9H_2O$ uz litru. Nātrija sulfīdu var pievienot arī no piemērota anaerobā izejšķīduma caur noslēgto testēšanas trauku aizbāžņiem, jo šī procedūra mazinās oksidācijas risku. Nātrija sulfīdu var aizstāt ar titāna (III) citrātu, ko pievieno caur noslēgto testēšanas trauku aizbāžņiem, ar galīgo koncentrāciju no 0,8 līdz 1,0 mmol/l. Titāna (III) citrāts ir ļoti efektīvs un maztoksisks reducētājs, kuru pagatavo šādi – izšķīdina 2,94 g trinātrija citrāta dihidrāta 50 ml ūdens, kas atbrīvots no skābekļa (iegūstot 200 mmol/l šķīduma), un pievieno 5 ml 15 % *(w/v)* titāna (III) hlorīda šķīduma. Neitralizē līdz pH 7 ± 0,2 ar minerālo sārmu un izšķīdina piemērotā traukā zem slāpekļa plūsmas. Titāna (III) citrāta koncentrācija šajā izejšķīdumā ir 164 mmol/l.

17. Samaisa testēšanas barotnes sastāvdaļas, izņemot reducētāju (nātrija sulfīdu vai titāna citrātu), un apsmidzina šo šķīdumu ar slāpekļa gāzi aptuveni 20 minūtes tieši pirms lietošanas, lai aizvāktu skābekli. Tad pievieno attiecīgu tilpumu svaigi pagatavota reducētāja šķīduma (kas pagatavots no skābekļa atbrīvotā ūdenī) tieši pirms barotnes lietošanas. Ja nepieciešams, pielāgo barotnes pH ar atšķaidītu minerālo skābi vai sārmu līdz 7 ± 0,2.

▼M6

Mikroelementu izejšķīdums (pēc izvēles)

18. Ieteicams, lai testēšanas barotne saturētu turpmāk minētos mikroelementus, kas uzlabos anaerobos noārdīšanās procesus, jo īpaši lietojot inokulātu ar zemu koncentrāciju (piem., 1 g/l) (11. literatūras avots).

Mangāna hlorīda tetrahidrāts ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borskābe (H_3BO_3)	5 mg
Cinka hlorīds ($ZnCl_2$)	5 mg
Vara (II) hlorīds ($CuCl_2$)	3 mg
Dinātrija molibdāta dihidrāts ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobalta hlorīda heksahidrāts ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Niķeļa hlorīda heksahidrāts ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinātrija selenīts (Na_2SeO_3)	5 mg
Pievieno no skābekļa atbrīvotu ūdeni (15. punkts)	līdz 1 litram

Testējamā viela

19. Pievieno testējamo vielu kā izejšķīdumu, suspensiju, emulsiju vai tiešā veidā kā cietvielu vai šķidrumu, vai kā absorbciju uz stikla šķiedras filtra, lai nodrošinātu koncentrāciju ar ne vairāk kā 100 mg/l organiskā oglekļa. Ja izmanto izejšķīdumus, sagatavo piemērotu šķīdumu ar ūdeni (15. punkts) (iepriekš to atbrīvo no skābekļa, apsmidzinot ar slāpekļa gāzi) tādā stiprumā, lai pievienotais tilpums būtu mazāks par 5 % kopējā reakcijas maisījuma tilpuma. Pielāgo izejšķīduma pH līdz pH 7 ± 0,2, ja nepieciešams. Attiecībā uz testējamajām vielām, kas pietiekami nešķīst ūdenī, iepazīstieties ar ISO 10634 (13). Ja izmanto šķīdinātāju, sagatavo papildu kontrolgrupu, kuras gaitā šķīdinātāju pievieno tikai inokulētajai barotnei. Jāizvairās no organiskiem šķīdinātājiem, par kuriem zināms, ka tie aizkavē metāna rašanos, piem., no hloroforma un oglekļa tetrahlorīda.

Brīdinājums. Ievērojiet piesardzību, rīkojoties ar toksiskajām testējamajām vielām un vielām, kuru īpašības nav zināmas.

Standartvielas

20. Standartvielas, piem., nātrija benzoāts, fenols un polietilēnglikols 400, ir sekmīgi lietotas procedūras pārbaudei, un 60 dienu laikā tās bioloģiski noārdījās par vairāk nekā 60 %. Sagatavo izvēlētās standartvielas izejšķīdumu (no skābekļa atbrīvotā ūdenī) tādā pašā veidā, kā testējamajai vielai, un pielāgo līdz pH 7 ± 0,2, ja nepieciešams.

Inhibēšanas kontroltests (ar nosacījumiem)

21. Lai iegūtu informāciju par testējamās vielas toksicitāti anaerobiem mikroorganismiem, meklējot vispiemērotāko testa koncentrāciju, testējamo vielu un standartvielu pievieno traukā ar testēšanas barotni (sk. 16. punktu), katru tajā pašā koncentrācijā, kā attiecīgi pievienojot (sk. 19. un 20. punktu un arī ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Pārstrādātās dūņas

22. Savāc pārstrādātās dūņas no bioreaktora notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, kurās pārsvarā attīra sadzīves notekūdeņus. Dūņas pilnībā raksturo, un to pamatinformāciju paziņo (sk. 54. punktu). Ja plāno izmantot pielāgotu inokulātu, var paredzēt arī pārstrādātās dūņas no rūpnieciskajām notekūdeņu attīrīšanas iekārtām. Lieto pudeles ar platiem kakliem, kas izgatavotas no īpaši blīva polietilēna vai cita līdzīga materiāla, kas spēj paplašināties, lai savāktu pārstrādātās dūņas. Dūņas iepilda līdz aptuveni 1 cm no pudeļu augšgala un cieši noslēdz, vislabāk ar drošības vārstu. Pēc atvešanas uz laboratoriju savāktās dūņas var izmantot tiešā veidā vai ievietot laboratorijas mēroga bioreaktorā. Izlaiž lieko biogāzi, piesardzīgi atverot dūņu pudeles. Kā inokulāta avotu var izmantot arī laboratorijā audzētas anaerobās dūņas, taču to aktivitātes spektrs var būt nepilnīgs.

Brīdinājums. Pārstrādātas dūņas izdala viegli uzliesmojošas gāzes, kas var aizdegties vai uzsprāgt; tās arī satur potenciāli patogēnus organismus, tādēļ ir jāveic atbilstoši piesardzības pasākumi, rīkojoties ar nogulsnēm. Drošības apsvērumu dēļ dūņu savākšanai nelieto stikla traukus.

23. Lai samazinātu fona gāzes rašanos un kontrolgrupas ietekmi, var paredzēt dūņu pirmapstrādi. Ja ir nepieciešama pirmapstrāde, dūņām ir jāļauj noārdīties, nepievienojot nekādas uzturvielas vai substrātus 35°C ± 2°C temperatūrā līdz septiņām dienām. Ir konstatēts, ka pirmapstrāde aptuveni piecu dienu garumā parasti optimāli samazina gāzes izdalīšanos kontroltestā, šajā testa posmā neradot nepieņemamus palielinājumus ne adaptācijas fāzes, ne arī inkubācijas periodā, un tā arī neizraisa aktivitātes zudumus nelielajam skaitam testēto vielu.

24. Attiecībā uz testējamajām vielām, kuras bioloģiski noārdās nepietiekamā mērā vai kurām paredzama šāda nepietiekamība, paredz testējamās vielas pirmsekspozīciju uz dūņām, lai varētu iegūt labāk pielāgotu inokulātu. Šādā gadījumā testējamo vielu pievieno pārstrādātajām dūņām organiskā oglekļa koncentrācijā no 5 mg/l līdz 20 mg/l un inkubē līdz divām nedēļām. Pirms lietošanas ekspozīcijai sagatavotās dūņas rūpīgi nomazgā (sk. 25. punktu), un testēšanas pārskatā norāda šīs pirmsekspozīcijas apstākļus.

Inokulāts

25. Dūņas mazgā (sk. 22.–24. punktu) tieši pirms lietošanas, lai samazinātu *IC* koncentrāciju galīgajā testa suspensijā līdz mazāk par 10 mg/l. Dūņas centrifugē hermētiski noslēgtās mēģenēs (piem., 3 000 g piecas minūtes) un izlej centrifugātu. Suspendē iegūto suspensiju barotnē, kas atbrīvota no skābekļa (16. un 17. punkts), vēlreiz centrifugē šo suspensiju un nolej centrifugāta šķidrumu. Ja *IC* nav pietiekami samazināts, dūņu mazgāšanas procedūru var atkārtot ne vairāk kā divas reizes. Var uzskatīt, ka tas nelabvēlīgi neietekmē mikroorganismus. Visbeidzot, suspendē suspensiju nepieciešamajā testēšanas barotnes tilpumā un nosaka kopējo cietvielu koncentrāciju [piem., ISO 11923 (15)]. Kopējo cietvielu galīgajai koncentrācijai testēšanas traukos ir jābūt diapazonā 1 g/l–3 g/l (jeb aptuveni 10 % cietvielu neatšķaidītās pārstrādātās dūņās). Minētās darbības veic tā, lai dūņu saskare ar skābekli būtu minimāla (piem., izmanto slāpekļa atmosfēru).

▼M6

TESTA PROCEDŪRA

26. Turpmāk minētās sākotnējās procedūras veic, lietojot metodes, kas nodrošina praktiski mazāko iespējamo saskari starp pārstrādātajām dūņām un skābekli, piem., var būt nepieciešams strādāt ar cimdu kasti slāpekļa atmosfērā un/vai iztīrīt pudeles ar slāpekli (4).

Testa un kontroltestu sagatavošana

27. Sagatavo vismaz trīs testēšanas trauku komplektus (sk. 13.b punktu) testējamajai vielai, kontrolgrupai bez testējamās vielas, standartvielai, kavēšanas kontrolgrupai (ar nosacījumiem) un spiediena kontroles kameras (izvēles procedūra) (sk. 7. un 19.–21. punktu). Var sagatavot arī papildu traukus, lai varētu novērtēt primāro bioloģisko noārdīšanos, izmantojot testējamajai vielai specifiskas analīzes. Vienu tīrā ūdens kontrolgrupas komplektu var izmantot vairākām testējamajām vielām tajā pašā testā, kamēr vien augšgala tilpumi ir pietiekami.

28. Sagatavo atšķaidītu inokulātu, pirms tā pievienošanas traukos, piem., izmantojot pipeti ar platu galu. Pievieno rūpīgi samaisīta inokulāta alikvotas (25. punkts), lai kopējo cietvielu koncentrācija būtu visos traukos vienāda (no 1 g/l līdz 3 g/l). Pielej testējamās vielas un standartvielas izejšķīdumus pēc pielāgošanas līdz pH 7 ± 0,2, ja nepieciešams. Testējamo vielu un standartvielu pievieno, izmantojot vispiemērotāko ievadīšanas ceļu (19. punkts).

29. Organiskā oglekļa testa koncentrācija parasti ir robežās no 20 līdz 100 mg/l (4. punkts). Ja testējamā viela ir toksiska, testa koncentrācija jāsamazina līdz 20 mg C/l vai pat zemāk, ja ir jāmēra tikai primārā bionoārdīšanās, veicot specifiskas analīzes. Jāpiebilst, ka testa rezultātu mainīgums palielinās, ja testa koncentrācijas ir zemākas.

30. Kontrolgrupas traukos ielej ekvivalentu izmantotās nesējvielas daudzumu, lai dozētu testējamo vielu, nevis izejšķīdumu, suspensiju vai emulsiju. Ja testējamo vielu pievieno caur stikla šķiedras filtriem vai ar organisko šķīdinātāju starpniecību, kontrolgrupas bez pievienotas ķīmiskās vielas testos izmanto filtru vai līdzvērtīga tilpuma šķīdinātāju, kas ir iztvaicēts. Sagatavo vēl vienu replikātu ar testējamo vielu, lai izmērītu pH vērtību. Pielāgo pH līdz 7 ± 0,2, ja nepieciešams, izmantojot nelielu daudzumu atšķaidītas minerālās skābes vai sārma. Visos testēšanas traukos jāpielej tādi paši apjomi neitralizācijas līdzekļu. Šīs vielas nav jāpielej, ja testējamās vielas un standartvielas izejšķīdumu pH vērtība jau ir pielāgota (sk. 19. un 20. punktu). Ja ir jāmēra primārā bionoārdīšanās, piemērots paraugs jāpaņem no pH kontroles trauka vai no testa papildu trauka, bet testējamās vielas koncentrācija jāmēra, veicot attiecīgās analīzes. Visos traukos var ievietot pārklātus magnētus, ja reakcijas maisījumi ir jāsamaisa (pēc izvēles).

31. Nodrošina, lai V_1 šķidruma kopējais tilpums un augšgala V_h tilpums būtu vienāds visos traukos; V_1 un V_h lielumus atzīmē un reģistrē. Visi trauki jānoslēdz ar gāzes necaurlaidīgu aizbāzni un jāpārvieto no cimdu kastes (sk. 26. punktu) uz inkubatoru (sk. 13.a punktu).

▼M6

Nešķīstošās testējamās vielas

32. Ūdenī slikti šķīstošo vielu nosvērtus apjomus tiešā veidā ielej sagatavotajos traukos. Ja nepieciešams lietot šķīdinātāju (sk. 19. punktu), testējamās vielas šķīdumu vai suspensiju ielej tukšos traukos. Ja iespējams, iztvaicē šķīdinātāju, laižot slāpekļa gāzi cauri šiem traukiem, un tad pievieno citas sastāvdaļas, proti, atšķaidītās dūņas (25. punkts) un no skābekļa atbrīvotu ūdeni, ja nepieciešams. Jāsagatavo arī papildu šķīdinātāja kontrolgrupa (sk. 19. punktu). Citas metodes nešķīstošo vielu pievienošanai ir apskatāmas ISO 10634 (13). Šķidrās testējamās vielas var dozēt ar šļirci pilnībā sagatavotos noslēgtos traukos, ja paredzams, ka sākotnējais pH nepārsniegs 7 ± 1, pretējā gadījumā dozē tā, kā minēts iepriekš (sk. 19. punktu).

Inkubācija un gāzes spiediena mērījumi

33. Sagatavotos traukus inkubē 35 °C ± 2 °C temperatūrā aptuveni vienu stundu, lai nodrošinātu uzbriešanu un izlaistu lieko gāzi atmosfērā, piem., kratot visus traukus pēc kārtas, ievietojot spiediena mērītāja adatu (13.c punkts) caur vāciņu un atverot vārstu, kamēr spiediena mērītājs uzrāda nulli. Ja šajā posmā vai starpposma mērījumu laikā augšgala spiediens ir mazāks par atmosfēras spiedienu, jāievada slāpekļa gāze, lai atjaunotu atmosfēras spiedienu. Vārstu noslēdz (sk. 13.c punktu) un turpina inkubāciju tumsā, nodrošinot, lai visas trauku daļas saglabātos pārstrādes temperatūrā. Pēc inkubācijas traukus novēro 24–48 stundas. Trauki nav derīgi, ja to saturs uzrāda izteiktu rozā iekrāsojumu centrifugāta šķidrumā, t. i., ja resazurīns (sk. 16. punktu) ir mainījis krāsu, norādot uz skābekļa klātbūtni (sk. 50. punktu). Kaut arī sistēma var pieļaut nelielu skābekļa apjomu, augstākas tā koncentrācijas var būtiski aizkavēt anaerobās bioloģiskās noārdīšanās gaitu. Viena trauka nejaušs nederīgums no trim trauku komplektiem vēl ir pieņemams, taču, ja rodas vēl citas papildu neprecizitātes, ir jāizmeklē eksperimenta procedūras un jāatkārto tests.

34. Rūpīgi samaisa katra trauka saturu, maisot vai kratot to vairākas minūtes vismaz divas vai trīs reizes nedēļā un īsi pirms katra spiediena mērījuma. Kratīšana atkal suspendē inokulātu un nodrošina gāzu līdzsvaru. Visi spiediena mērījumi ir jāveic ātri, jo testēšanas traukiem var pazemināties temperatūra, izraisot neprecizitātes rādījumos. Mērot spiedienu, visiem testēšanas traukiem, arī augšgalā, ir jāsaglabājas pārstrādes temperatūrā. Gāzes spiedienu mēra, piem., ievadot caur aizbāzni šļirces adatu (13.c punkts), kas pievienota spiediena uzraudzības mērītājam. Jāparūpējas par to, lai šļirces adatā neiekļūtu ūdens; ja tā notiek, mitrās daļas ir jāizžāvē un jāņem jauna adata. Spiedienu mēra milibāros (sk. 42. punktu). Gāzes spiedienu traukos var mērīt periodiski, piem., reizi nedēļā, un tad pēc izvēles var izlaist atmosfērā lieko gāzi. Cita iespēja ir mērīt spiedienu tikai testa beigās, lai noteiktu saražotās biogāzes apjomu.

35. Ieteicams nolasīt arī gāzes spiediena starpposma rādījumus, jo spiediena palielināšanās ļauj izprast, kad testu var izbeigt, un uzraudzīt kinētiku (sk. 6. punktu).

▼M6

36. Parasti testu beidz pēc 60 dienu inkubācijas perioda, ja vien bioloģiskās noārdīšanās līkne, kas iegūta no spiediena mērījumiem, nesasniedz stacionāro posmu agrāk; tas ir posms, kurā sasniegtā maksimālā noārdīšanās un bioloģiskās noārdīšanās līkne izlīdzinās. Ja stacionārās fāzes vērtība ir mazāka par 60 %, interpretācija ir apgrūtināta, jo tā liecina par to, ka tikai daļa molekulas ir mineralizējusies vai ir pieļauta kāda kļūda. Ja parastā inkubācijas perioda beigās gāze ir saražota, bet stacionārais posms acīmredzami nav sasniegts, jāapsver iespēja pagarināt testu, lai varētu pārbaudīt, vai stacionārā fāze (> 60 %) tiks sasniegta.

Neorganiskā oglekļa mērīšana

37. Testa beigās pēc pēdējā gāzes spiediena mērījuma, dūņām ļauj nostādināties. Atver visus traukus pēc kārtas un uzreiz paņem paraugus neorganiskā oglekļa *(IC)* koncentrācijas (mg/l) noteikšanai centrifugāta šķidrumā. Centrifugāta šķidrumam neveic ne centrifugēšanu, ne filtrēšanu, jo var rasties nepieņemami izšķīdinātā oglekļa dioksīda zudumi. Ja šo šķidrumu nevar analizēt parauga ņemšanas brīdī, to uzglabā noslēgtā flakonā bez tukšā augšgala un atdzesē līdz aptuveni 4 °C ne ilgāk kā divas dienas. Pēc *IC* izmērīšanas mēra un reģistrē pH vērtību.

38. Cita iespēja ir noteikt *IC* centrifugātā netieši, izdalot izšķīdināto *IC* kā oglekļa dioksīdu, ko var izmērīt augšgalā. Pēc gāzes spiediena pēdējā mērījuma pielāgo spiedienu katrā testēšanas traukā, sasniedzot atmosfēras spiedienu. Visos traukos saturu skābina līdz aptuveni pH 1, pievienojot koncentrētu minerālo skābi (piem., H_2SO_4) caur noslēgto trauku aizbāžņiem. Sakratītos traukus inkubē 35 °C ± 2 °C temperatūrā aptuveni 24 stundas un izmēra gāzes spiedienu, ko rada izveidojies oglekļa dioksīds, izmantojot spiediena mērītāju.

39. Veic līdzīgus nolasījumus attiecībā uz atbilstošo tukšā testa, standartvielas un, ja ir iekļauti, arī kavēšanās kontrolgrupas traukiem (sk. 21. punktu).

40. Dažos gadījumos, jo īpaši tad, kad tos pašus kontrolgrupas traukus izmanto vairākām testējamām vielām, ir jāparedz mērījumu veikšana par starpposma *IC* koncentrācijām testa un kontrolgrupas traukos, ja attiecināms. Šādos gadījumos ir jāsagatavo pietiekams skaits trauku visiem starpposma mērījumiem. Labāk ir veikt šo procedūru, nevis ņemt visus paraugus tikai no viena trauka. No viena trauka paraugus var ņemt tikai tad, kad *DIC* analīzēm nepieciešamais tilpums nav uzskatāms par pārāk lielu. *DIC* mērīšana jāveic pēc tam, kad ir izmērīts gāzes spiediens, neizlaižot lieko gāzi, kā izklāstīts turpmāk:

— iespējami mazāku centrifugāta parauga tilpumu paņem ar šļirci caur aizbāzni, neatverot traukus, un nosaka *IC* paraugā;

— pēc parauga paņemšanas lieko gāzi izlaiž vai neizlaiž;

— jāņem vērā, ka pat neliels centrifugāta apjoma samazinājums (piem., aptuveni 1 %) var būtiski palielināt gāzes daudzumu augšgalā (V_h);

— nepieciešamības gadījumā izlabo vienādojumus (sk. 44. punktu), palielinot V_h 3. vienādojumā.

▼M6

Specifiskās analīzes

41. Ja ir jānosaka primārā anaerobā noārdīšanās (sk. 30. punktu), piemērotu parauga tilpumu attiecīgajai analīzei paņem testa sākumā un beigās no traukiem, kas satur testējamo vielu. Ja tā dara, jāievēro, ka augšgala tilpums (V_h) un šķidruma tilpums (V_l) mainīsies, un tas būs jāņem vērā, aprēķinot gāzes ražošanas rezultātus. Paraugus attiecīgajai analīzei var paņemt arī no papildu maisījumiem, kas iepriekš sagatavoti šim nolūkam (30. punkts).

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Praktisku apsvērumu dēļ gāzes spiedienu mēra milibāros (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), tilpumu litros un temperatūru grādos pēc Celsija.

Oglekļa daudzums no šķidruma brīvajā trauka daļā

43. Tā kā 1 mols metāna un 1 mols oglekļa dioksīda katrs satur 12 g oglekļa, oglekļa masu dotajā izdalījušās gāzes tilpumā var izteikt šādi.

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{1. vienādojums}$$

kur:

m = oglekļa masa (mg) dotajā izdalījušās gāzes tilpumā;

12 = oglekļa relatīvā atommasa;

n = gāzes molu skaits dotajā tilpumā.

Ja ievērojamos apjomos tiek radīta cita gāze, kas nav metāns vai oglekļa dioksīds (piem., N_2O), 1. formulu maina, lai paredzētu iespējamās izdalīto gāzu ietekmes.

44. Saskaņā ar gāzes noteikumiem *n* var izteikt šādi:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{2. vienādojums}$$

kur:

p = gāzes spiediens (paskālos);

V = gāzes tilpums (m^3);

R = gāzes molārā konstante [8,314 J/(mol K)];

T = inkubācijas temperatūra (kelvinos).

1. un 2. vienādojuma apvienošana un to racionalizēšana, ļauj veikt gāzes ražošanas aprēķinu kontroltestiem:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{3. vienādojums}$$

kur:

m_h = neto oglekļa masa, kas saražota kā gāze augšgalā (mg);

D*p* = vidējā starpība starp sākotnējo un beigu spiedienu testēšanas traukos, atņemot no tās attiecīgo vidējo lielumu kontrolgrupas bez pievienotās ķīmiskās vielas traukos (milibāros);

▼**M6**

V_h = tilpums trauka augšgalā (l);

0,1 = abos gadījumos ņūtonu/m^2 konversija milibāros un m^3 konversija litros.

4. vienādojums jālieto parastai inkubācijas temperatūrai 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{4. vienādojums}$$

Piezīme. Alternatīvs tilpuma aprēķins. Spiediena mērītāja rādījumus pārvērš saražotās gāzes ml, izmantojot standarta līkni, kas iegūta, atzīmējot ievadīto tilpumu (ml), salīdzinājumā ar mērītāja rādījumiem (2. papildinājums). Gāzes molu skaitu (n) katra trauka augšgalā aprēķina, izdalot kumulatīvo saražotās gāzes apjomu (ml) ar 25 286 ml/mols, kas ir tilpums, kādu aizņem viens gāzes mols 35 °C temperatūrā un standarta atmosfēras spiediena apstākļos. Tā kā 1 mols CH_4 un 1 mols CO_2 katrs satur 12 g oglekļa, oglekļa apjoms (mg) augšgalā (m_h) ir parādīts 5. vienādojumā:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{5. vienādojums}$$

Racionalizē, lai varētu veikt gāzes ražošanas kontrolgrupas testu:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{6. vienādojums}$$

kur:

m_h = neto oglekļa masa, kas saražota kā gāze augšgalā (mg);

DV = vidējā starpība starp gāzes tilpumu, kas saražots testēšanas trauku augšgalā un kontrolgrupas bez pievienotas ķīmiskās vielas trauku augšgalā;

25286 = tilpums, ko aizņem 1 mols gāzes 35 °C temperatūrā 1 atmosfēras spiediena apstākļos.

45. Bioloģiskās noārdīšanās gaitu var izsekot, atzīmējot apvienoto spiediena palielinājumu Dp (milibāros), salīdzinājumā ar laiku, ja attiecināms. No šīs līknes identificē un reģistrē adaptācijas fāzi (dienās). Adaptācijas fāze ir laiks no testa sākuma līdz būtiskas noārdīšanās sākumam (piemēru sk. 3. papildinājumā). Ja tiek paņemti un analizēti centrifugāta starpposma paraugi (sk. 40., 46. un 47. punktu), var atzīmēt kopējā saražotā oglekļa daudzumu (gāzē, kā arī šķidrumā), nevis tikai kumulatīvo spiedienu.

Ogleklis šķidrumā

46. Metāna apjomu šķidrumā ignorē, jo ir zināms, ka tā šķīdība ūdenī ir ļoti zema. Neorganiskā oglekļa masu testēšanas trauku šķidrumā aprēķina saskaņā ar 7. vienādojumu:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{7. vienādojums}$$

kur:

m_l = neorganiskā oglekļa masa šķidrumā (mg);

C_{net} = neorganiskā oglekļa koncentrācija testēšanas traukos, atņemot no tās koncentrāciju kontrolgrupas bez pievienotas ķīmiskās vielas traukos testa beigās (mg/l);

V_l = šķidruma tilpums traukā (l).

▼M6

Kopējais gāzveida ogleklis

47. Gāzveida oglekļa kopējo masu traukā aprēķina saskaņā ar 8. vienādojumu:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{8. vienādojums}$$

kur:

m_t = gāzveida oglekļa kopējā masa (mg);

m_h un m_l ir tādi, kā iepriekš minēts.

Testējamās vielas ogleklis

48. No pievienotās testējamās vielas iegūtā oglekļa masu testēšanas traukos aprēķina saskaņā ar 9. vienādojumu:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{9. vienādojums}$$

kur:

m_v = testējamās vielas oglekļa masa (mg);

C_c = testējamās vielas oglekļa koncentrācija testēšanas traukos (mg/l);

V_l = šķidruma tilpums testēšanas traukā (l).

Bioloģiskās noārdīšanās pakāpe

49. Procentuālo bioloģisko noārdīšanos no virspusē uzkrātās gāzes aprēķina saskaņā ar 10. vienādojumu, bet kopējo procentuālo bioloģisko noārdīšanos – saskaņā ar 11. vienādojumu:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{10. vienādojums}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{11. vienādojums}$$

kur:

D_h = bionoārdīšanās no virspusē uzkrātās gāzes (%);

D_t = kopējā bionoārdīšanās (%);

m_h, m_v un m_t ir tādi, kā iepriekš minēts.

Primārās bioloģiskās noārdīšanās pakāpi aprēķina, pamatojoties uz testējamās vielas koncentrācijas (izvēles) mērījumiem inkubācijas sākumā un beigās saskaņā ar 12. vienādojumu:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{12. vienādojums}$$

kur:

D_p = testējamās vielas primārā noārdīšanās (%);

S_i = testējamās vielas sākotnējā koncentrācija (mg/l);

S_e = testējamās vielas koncentrācija beigās (mg/l).

Ja analīzes metode liecina par testējamās vielas būtiskām koncentrācijām nemainītā anaerobā dūņu inokulātā, izmanto 13. vienādojumu:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_t - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{13. vienādojums}$$

kur:

$D_p^{\,1}$ = koriģētā testējamās vielas primārā noārdīšanās (%);

S_{ib} = sākotnējā "acīmredzamā" testējamās vielas koncentrācija kontrolgrupu testos (mg/l);

S_{eb} = "acīmredzamā" testējamās vielas beigu koncentrācija kontrolgrupu testos (mg/l).

Rezultātu derīgums

50. Izmanto spiediena rādījumus tikai no tiem traukiem, kuros nav vērojams rozā iekrāsojums (sk. 33. punktu). Piesārņojumu ar skābekli samazina līdz minimumam, izmantojot atbilstošas anaerobās rīcības metodes.

51. Jāņem vērā, ka tests ir derīgs, ja standartviela sasniedz stacionāro fāzi, kas pārstāv vairāk nekā 60 % bioloģiskās noārdīšanās ([1]).

52. Ja testa beigās pH pārsniedz diapazonu 7 ± 1 un bionoārdīšanās notiek nepietiekami, testu atkārto ar palielinātu barotnes buferšķīduma spēju.

Noārdīšanās kavēšana

53. Gāzes ražošanai traukos, kas satur testējamo vielu un standartvielu, jābūt vismaz tādā līmenī, kā gāzes ražošanai traukos, kas satur tikai standartvielu; pretējā gadījumā pazīmes liecina par gāzes ražošanas kavēšanu. Dažos gadījumos gāzes ražošana traukos, kas satur testējamo vielu, bet nesatur standartvielu, ir mazāka nekā ražošana kontrolgrupā bez pievienotas ķīmiskās vielas, un tas liecina, ka testējamā viela ir kavējoša.

Testēšanas pārskats

54. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā viela:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, *CAS* numurs, struktūrformula un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— testējamās vielas tīrība (piemaisījumi).

Testēšanas apstākļi:

— atšķaidītā pārstrādes šķidruma tilpums (V_l) un augšgala tilpums (V_h) traukā;

— testēšanas trauku apraksts, biogāzes mērīšanas galvenās īpašības (piem., spiediena mērītāja tips) un *IC* analizatora galvenās īpašības;

— testējamās vielas un standartvielas piemērošana testēšanas sistēmai – izmantotā testa koncentrācija un jebkādu šķīdinātāju lietošana;

— informācija par izmantoto inokulātu – notekūdeņu attīrīšanas iekārtas nosaukums, attīrīto notekūdeņu avota apraksts (piem., ekspluatācijas temperatūra, dūņu uzglabāšanas laiks, sadzīves notekūdeņu pārsvars utt.), koncentrācija, jebkura informācija, kas nepieciešama minētā pamatošanai, un informācija par jebkuru iepriekšēju inokulāta apstrādi (piem., pirmapstrādi, pirmsekspozīciju);

— inkubācijas temperatūra;

— replikātu skaits.

([1]) Tas ir jāpārvērtē vēlreiz, ja izmanto arī adsorbcijas un nešķīstošas standartvielas.

▼M6

Rezultāti:

— pH un *IC* vērtības testa beigās;

— testējamās vielas koncentrācija testa sākumā un beigās, ja tiek veikti specifiski mērījumi;

— visi izmērītie dati, kas savākti attiecīgi testa, kontrolgrupas bez pievienotas ķīmiskās vielas, standartvielas un inhibēšanas kontrolgrupas traukos (piem., spiediens milibāros un neorganiskā oglekļa koncentrācija (mg/l)) un apkopoti tabulas veidā (izmērītie dati par augšgalu un šķidrumu ir jāpaziņo atsevišķi);

— datu statistiskā apstrāde, testēšanas ilgums un diagramma par testējamās vielas un standartvielas bioloģisko noārdīšanos un inhibēšanas kontroli;

— testējamās vielas un standartvielas bionoārdīšanās procentos;

— ikviena testa rezultātu nepieņemšanas iemesli;

— rezultātu apspriešana.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma nodaļas:

C.4. nodaļa. Tūlītējas bionoārdāmības noteikšana;

C.9. nodaļa. Bionoārdīšanās – *Zahn-Wellens* tests;

C.10. nodaļa. Imitācijas tests – aerobā notekūdeņu attīrīšana:

A. Aktivēto dūņu vienības, B. Bioplēves;

C.11. nodaļa. Bionoārdīšanās: aktivēto dūņu elpošanas inhibēšanas tests.

(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.

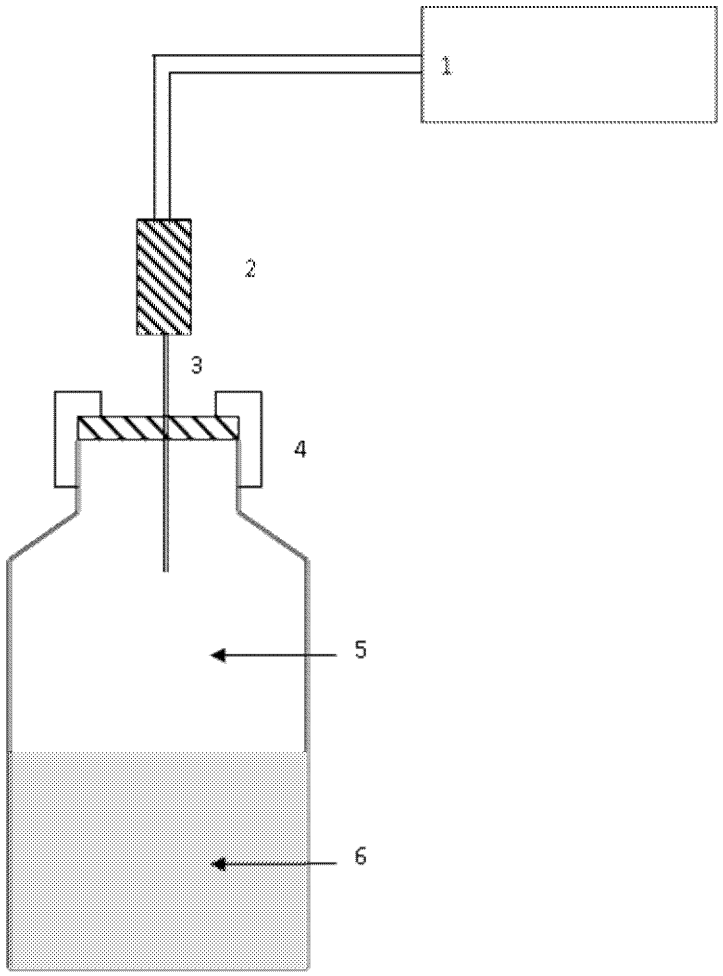
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

1. *papildinājums*

Iekārtas piemērs gāzes spiediena apstākļos saražotās biogāzes mērīšanai



Skaidrojums

1. Spiediena mērītājs

2. Gāzes necaurlaidīgs trīsvirzienu vārsts

3. Šļirces adata

4. Gāzes necaurlaidīgs blīvējums (gofrēts vāciņš un aizbāznis)

5. Augšgals (V_h)

6. Pārstrādātu dūņu inokulāts (V_I)

Testēšanas trauki 35 °C ± 2 °C temperatūras vidē.

▼M6

2. papildinājums

Spiediena mērītāja konversija

Spiediena mērītāja rādījumus var saistīt ar gāzes tilpumiem, izmantojot standarta līkni, kas iegūta, ievadot zināmus gaisa tilpumus 35 °C ± 2 °C temperatūrā seruma pudelēs, kurās ūdens tilpums ir vienāds ar reakcijas maisījuma tilpumu, V_R:

— sagatavo V_R ml tāda ūdens alikvotu, kas turēts 35 °C ± 2 °C temperatūrā, piecās seruma pudelēs. Noslēdz šīs pudeles un ievieto ūdens vannā 35 °C temperatūrā uz vienu stundu uzbriešanai;

— ieslēdz spiediena mērītāju, ļauj tam stabilizēties un noregulē uz nulli;

— iebāž šļirces adatu caur blīvējumu vienā no pudelēm, atver vārstu līdz brīdim, kamēr spiediena mērītājs rāda nulli, un aizver vārstu;

— atkārto šo procedūru ar pārējām pudelēm;

— ievada 1 ml gaisa 35 °C ± 2 °C temperatūrā katrā pudelē. Iebāž (mērītāja) adatu caur blīvējumu vienā no pudelēm un ļauj spiediena rādījumiem stabilizēties. Reģistrē spiedienu, atver vārstu līdz brīdim, kamēr spiediens rāda nulli, un tad aizver vārstu;

— atkārto šo procedūru ar pārējām pudelēm;

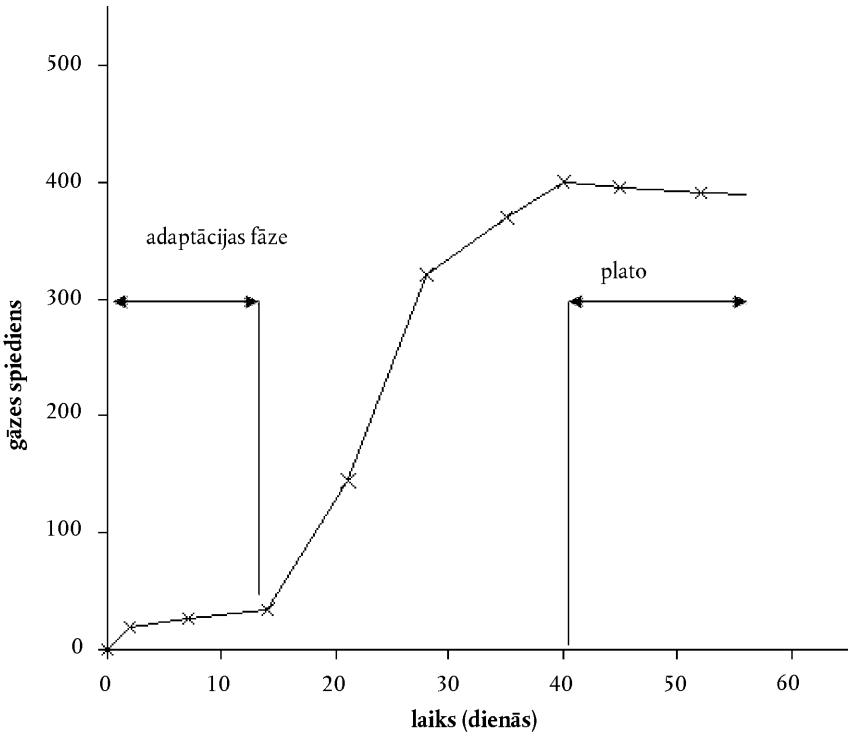
— atkārto visu minēto procedūru, izmantojot 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml un 50 ml gaisa;

— atzīmē spiediena (Pa) konversijas līkni, salīdzinājumā ar ievadīto gāzes tilpumu Vb (ml). Instrumenta reakcija ir lineāra diapazonā 0 Pa–70 000 Pa un 0 ml–50 ml saražotās gāzes.

▼**M6**

3. papildinājums

Noārdīšanās līknes piemērs (kumulatīvais neto spiediena palielinājums)



▼M6

4. papildinājums

Datu lapu piemērs anaerobās bioloģiskās noārdīšanās TESTAM – Datu lapa testējamajai vielai

Laboratorija:..... Testējamā viela:..... Testa Nr.:.....

Testa temperatūra (°C):..... Augšgala tilpums (V_h): .....(l) Šķidruma tilpums (V_l): .....(l)

Ogleklis testa vielā $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Diena	p_1 (tests) (mbar)	p_2 (tests) (mbar)	p_3 (tests) (mbar)	p (tests) vidēji (mbar)	p_4 (tukšais tests) (mbar)	p_5 (tukšais tests) (mbar)	p_6 (tukšais tests) (mbar)	p (tukšais tests) vidēji (mbar)	p (neto) tests – tukšais tests vidēji (mbar)	$D\ p$ (neto) kumulatīvi (mbar)	m_h augšgala C [2] (mg)	D_h bionoārdīšanās [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ tests (mg)	$C_{IC,\ 2}$ tests (mg)	$C_{IC,\ 3}$ tests (mg)	C_{IC} tests vidēji (mg)	$C_{IC,\ 4}$ tukšais tests (mg)	$C_{IC,\ 5}$ tukšais tests (mg)	$C_{IC,\ 6}$ Tukšais tests (mg)	C_{IC} Tukšais tests vidēji (mg)	$C_{IC,\ net}$ tests – tukšais tests vidēji (mg)	m_l šķidrais C [4] (mg)	m_t kopējais C [5] (mg)	D_t bionoārdīšanās [6] (%)
IC (beigās)												
pH (beigās)												

[1] Ogleklis testa traukā, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$.
[2] Ogleklis augšgalā, m_h (mg) parastā inkubācijas temperatūrā (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$.
[3] Bionoārdīšanās, kas aprēķināta no augšgala gāzes, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$.
[4] Ogleklis šķidrumā, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times Vl$.
[5] Kopējais gazificētais ogleklis, m_t (mg): $m_t + m_l$.
[6] Kopējā bionoārdīšanās, D_t (%): $D_t = (mt \times 100)/m_v$.

02008R0440 — LV — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratorija:..... Standartviela:..... Testa Nr.:.....

Testa temperatūra (°C):..... Augšgala tilpums (V_h): .....(l) Šķidruma tilpums (V_l) (litros):.....

Ogleklis standartvielā $C_{c,v}$ (mg/l):..... m_v ([1]) (mg):.....

Diena	p_1 (standartviela) (mbar)	p_2 (standartviela) (mbar)	p_3 (standartviela) (mbar)	p (standartviela) vidēji (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) vidēji (mbar)	p (standartviela) standartviela – tukšais tests (mbar)	$D\ p$ (standartviela) kumulatīvi (mbar)	m_h augšgala C ([2]) (mg)	D_h bionoārdīšanās ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ standartviela (mg)	$C_{IC,\ 2}$ standartviela (mg)	$C_{IC,\ 3}$ standartviela (mg)	C_{IC} standartviela vidēji (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. vidēji (mg)	$C_{IC,\ net}$ standartviela – inhib. (mg)	m_l šķidrais C ([4]) (mg)	m_t kopējais C ([5]) (mg)	D_t bionoārdīšanās ([6]) (%)
IC (beigās)												
pH (beigās)												

([1]) Ogleklis testa traukā, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$.
([2]) Ogleklis augšgalā, m_h (mg) parastā inkubācijas temperatūrā (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$.
([3]) Bionoārdīšanās, kas aprēķināta no augšgala gāzes, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$.
([4]) Ogleklis šķidrumā, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$.
([5]) Kopējais gazificētais ogleklis, m_t (mg): $m_t + m_l$.
([6]) Kopējā bionoārdīšanās, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$.

▼M6

C.44. IZSKALOŠANĀS AUGSNES KOLONNĀS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 312 (2004. gads). Cilvēku radītas ķīmiskās vielas var nonākt augsnē tiešā veidā, tās apzināti lietojot (piem., lauksaimniecībā izmantojamās ķīmiskās vielas), vai netiešā ceļā (piem., notekūdeņi → notekūdeņu dūņas → augsne vai gaiss → mitrā/sausā nogulsnēšanās). Šo ķīmisko vielu radītā riska novērtēšanai ir svarīgi aplēst to potenciālās ķīmiskās reakcijas augsnē un pārvietošanos (izskalošanos) dziļākos augsnes slāņos un iespējams pat gruntsūdeņos.

2. Ir pieejamas vairākas metodes, ar ko kontrolētos laboratorijas apstākļos mēra ķīmisko vielu potenciālo izskalošanos augsnē, t. i., augsnes plānslāņa hromatogrāfija, augsnes biezslāņa hromatogrāfija, augsnes kolonnas hromatogrāfija un adsorbcijas–desorbcijas mērījumi (1)(2). Nejonizētām ķīmiskajām vielām n-oktanola-ūdens sadalījuma koeficients (P_{ow}) ļauj laikus aplēst to adsorbcijas un izskalošanās potenciālu (3)(4)(5).

3. Šeit aprakstītā testēšanas metode balstās uz augsnes kolonnas hromatogrāfiju sajauktā augsnē (definīciju sk. 1. papildinājumā). Ir veikti divu veidu eksperimenti, lai kontrolētos laboratorijas apstākļos noteiktu i) testējamās ķīmiskās vielas izskalošanās potenciālu un ii) reakciju produktu izskalošanās potenciālu (pētījums ar izturētām atliekām) augsnēs ([1]). Šīs testēšanas metodes pamatā ir esošās metodes (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. ESAO seminārā par augsnes/sedimentu atlasi, kas 1995. gadā notika Beldžiratē, Itālijā (12), vienojās par šajā testēšanas metodē izmantojamo augšņu skaitu un tipu, kā arī sniedza ieteikumus attiecībā uz augsnes paraugu vākšanu, apstrādi un uzglabāšanu izskalošanās eksperimentu nolūkiem.

TESTA METODES PRINCIPS

5. Kolonnas, kas veidotas no pietiekami inerta materiāla (piem., stikla, nerūsējošā tērauda, alumīnija, teflona, PVH utt.), piepilda ar augsni un pēc tam piesātina un līdzsvaro ar "mākslīgā lietus" šķīdumu (definīciju sk. 1. papildinājumā) un ļauj tām notecēt. Tad katras augsnes kolonnas virsmu apstrādā ar testējamo ķīmisko vielu un/vai izturētām testējamās ķīmiskās vielas atliekām. Pēc tam augsnes kolonnas aplej ar "mākslīgā lietus" šķīdumu un savāc izskalojumus. Pēc izskalošanas procesa augsni izņem no kolonnām un sadala atbilstošā segmentu skaitā, atkarībā no informācijas, kas jāiegūst pētījumā. Katru augsnes segmentu un izskalojumu pēc tam analizē attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu un, ja attiecināms, reakciju produktiem vai citām interesējošām ķīmiskajām vielām.

TESTĒŠANAS METODES IZMANTOJAMĪBA

6. Testēšanas metodi piemēro testējamajām ķīmiskajām vielām (nemarķētām vai radioaktīvi marķētām, piem., ^{14}C), kurām ir pieejama pietiekami precīza un jutīga analīzes metode. Testēšanas metodi nepiemēro ķīmiskajām vielām, kuras ir gaistošas no augsnes un ūdens un tādēļ šīs testēšanas metodes eksperimentālajos apstākļos nesaglabājas augsnē un/vai izskalojumā.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

7. Nemarķētas vai radioaktīvi marķētas testējamās ķīmiskās vielas var izmantot izskalošanās procesu mērīšanai augsnes kolonnās. Radioaktīvi marķēts materiāls ir nepieciešams reakciju produktu (testējamo ķīmisko vielu izturēto atlieku) izskalošanās izpētei un masas līdzsvara noteikšanai. ^{14}C marķējums ir

([1]) Kolonnas izskalošanās pētījumi ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem var sniegt mobilitātes informāciju par testējamo ķīmisko vielu un tās reakciju produktiem un var papildināt sorbcijas pētījumu kopu.

▼M6

ieteicams, taču var noderēt arī citi izotopi, piem., ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H un ^{32}P. Ja iespējams, jāiezīmē molekulas stabilākās daļas. Testējamās ķīmiskās vielas tīrībai jābūt vismaz 95 %.

8. Lielākā daļa ķīmisko vielu ir jālieto kā atsevišķas vielas. Tomēr attiecībā uz darbīgajām vielām augu aizsardzības līdzekļos var izmantot sintezētus produktus, lai pētītu testējamās pamatvielas izskalošanos, bet to testēšana ir īpaši nepieciešama, ja maisījums var ietekmēt izdalīšanās ātrumu (piem., granulētās vai kontrolēti izdalītās sintezētās vielas). Atkarībā no testējamā maisījuma specifiskajām testēšanas plāna prasībām, pirms testa veikšanas būtu ieteicams konsultēties ar regulatīvajām iestādēm. Izturēto atlieku izskalošanās pētījumos ir jāizmanto tīras testa pamatvielas.

9. Pirms izskalošanās testu veikšanas augsnes kolonnās ir ieteicams noskaidrot šādu informāciju par testējamo ķīmisko vielu:

(1) šķīdība ūdenī [A.6. testēšanas metode] (13);

(2) šķīdība organiskajos šķīdinātājos;

(3) tvaika spiediens [A.4. testēšanas metode] (13) un Henrija likuma konstante;

(4) n-oktanola/ūdens sadalījuma koeficients [A.8. un A.24. testēšanas metode] (13);

(5) adsorbcijas koeficients (K_d, K_f vai K_{OC}) [C.18. un/vai C.19. testēšanas metode] (13);

(6) hidrolīze [C.7. testēšanas metode] (13);

(7) disociācijas konstante (pK_a) [ESAO *TG* 112] (25);

(8) aerobās un anaerobās reakcijas augsnē [C.23. testēšanas metode] (13).

Piezīme. Temperatūru, kurā šie mērījumi veikti, jānorāda attiecīgajos testēšanas pārskatos.

10. Testējamās ķīmiskās vielas apjomam, ar ko apstrādā augsnes kolonnas, jābūt pietiekamam, lai varētu detektēt vismaz 0,5 % ievietotās devas katrā atsevišķajā segmentā. Attiecībā uz darbīgajām ķīmiskajām vielām augu aizsardzības līdzekļos – izmantotās testējamās ķīmiskās vielas apjoms var atbilst maksimālajam ieteicamajam lietošanas rādītājam (vienā apstrādes reizē).

11. Testējamās ķīmiskās vielas un, ja attiecināms, tās reakciju produktu augsnē un izskalojumos izteikšanai kvantitatīvā izteiksmē ir jāizmanto atbilstoša analīzes metode ar zināmu pareizību, precizitāti un jutīgumu. Zināmai ir jābūt arī analītiskajai noteikšanas robežai attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu un būtiskajiem tās reakciju produktiem (parasti tie ir vismaz visi tie reakciju produkti, kas ≥ 10 % izmantotās devas un novēroti reakciju ķēdes izpētē, taču vislabāk – jebkuri attiecīgie bīstamie reakciju produkti) (sk. 17. punktu).

▼M6

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

12. Novērtējot testējamās ķīmiskās vielas relatīvo mobilitāti augsnē, jāizmanto standartvielas ar zināmiem izskalošanās parametriem, piem., atrazīns vai monurons, ko var uzskatīt par vielām ar mērenu izskalošanos (1)(8)(11). Lai apliecinātu augsnes kolonnas hidrodinamiskās īpašības, var noderēt arī nesorbējošas un nenoārdāmas polāras standartvielas (piem., tritijs, bromīdi, fluoresceīns un eozīns), kas iezīmē ūdens kustību kolonnā.

13. Analītiskās standartvielas var noderēt, arī lai varētu raksturot un/vai apzināt reakciju produktus, kas konstatēti augsnes segmentos un izskalojumos, izmantojot hromatogrāfiju, spektroskopiju vai citas attiecīgas metodes.

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENĪBAS

14. Sk. 1. papildinājumu.

KVALITĀTES KRITĒRIJI

Atgūstamība

15. Augsnes segmentos un kolonnas izskalojumos pēc izskalošanās konstatētā testējamās ķīmiskās vielas procentuālo daļu summa raksturo atgūstamību, kas panākta izskalošanās eksperimentā. Atgūtajām vielām jābūt diapazonā no 90 līdz 110 % radioaktīvi marķētām ķīmiskajām vielām (11) un no 70 līdz 110 % nemarķētām ķīmiskajām vielām (8).

Analītiskās metodes atkārtojamība un jutība

16. Analītiskās metodes atkārtojamību, lai varētu kvantitatīvi izteikt testējamo ķīmisko vielu un tās reakciju produktus, var pārbaudīt, veicot divkāršu analīzi vienam un tam pašam augsnes segmenta vai izskalojuma ekstraktam (sk. 11. punktu).

17. Analītiskās metodes detektēšanas robežai *(LOD)* attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu un tās reakciju produktiem jābūt vismaz 0,01 mg $\cdot$ kg^{-1} katrā augsnes segmentā vai izskalojumā (kā testējamajā ķīmiskā viela) vai 0,5 % izmantotās devas jebkurā atsevišķā segmentā, atkarībā no tā, kurš rādītājs zemāks. Ir jānorāda arī kvantitatīvās noteikšanas robeža *(LOQ)*.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Testa sistēma

18. Testā izmanto izskalošanās kolonnas (sadalāmas vai nesadalāmas sekcijās), kas izgatavotas no pietiekami inerta materiāla (piem., stikla, nerūsējošā tērauda, alumīnija, teflona, PVH utt.), ar iekšējo diametru vismaz 4 cm un minimālo augstumu 35 cm. Kolonnas materiāliem ir jāpārbauda, vai tie nevar reaģēt ar testējamo ķīmisko vielu un/vai tās reakciju produktiem. Piemēri par derīgām kolonnām, kas ir vai nav sadalāmas sekcijās, ir sniegti 2. papildinājumā.

19. Augsnes kolonnu piepildīšanai un iepakošanai izmanto karoti, virzuli un vibratoru.

20. Lai augsnes kolonnas aplietu ar mākslīgo lietu, var izmantot virzuļu vai peristaltiskos sūkņus, dušas sadalītājus, Mariotas pudeles vai vienkāršas pilināmās piltuves.

▼M6

Laboratorijas iekārtas un ķīmiskās vielas

21. Nepieciešamas standarta laboratorijas iekārtas, konkrēti, turpmāk minētās:

(1) analītiskie instrumenti, piem., *GLC, HPLC* un *TLC* iekārtas, tostarp atbilstošas detektēšanas sistēmas marķēto vai nemarķēto ķīmisko vielu analizēšanai, vai inversā izotopu atšķaidīšanas metode;

(2) instrumenti identificēšanai (piem., *MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR* utt.);

(3) šķidro scintilāciju skaitītājs radioaktīvi marķētai testējamajai ķīmiskajai vielai;

(4) oksidētājs marķētā materiāla sadedzināšanai;

(5) ekstrakcijas aparāts (piem., centrifūgas mēģenes aukstajai ekstrakcijai un Soksleta aparāts nepārtrauktai ekstrakcijai atteces apstākļos);

(6) instrumentārijs koncentrētiem šķīdumiem un ekstraktiem (piem., rotējošs iztvaicētājs).

22. Izmanto tādas ķīmiskās vielas kā analītiskās tīrības pakāpes organiskie šķīdinātāji, piem., acetons, metanols utt., scintilācijas šķidrumu, 0,01 M $CaCl_2$ šķīdumu destilētā vai dejonizētā ūdenī (= "mākslīgo lietu").

Testējamā ķīmiskā viela

23. Lai augsnes kolonnu varētu apstrādāt ar testējamo ķīmisko vielu, tā jāizšķīdina (dejonizētā vai destilētā) ūdenī. Ja testējamā ķīmiskā viela nepietiekami šķīst ūdenī, to var izmantot kā sintezētu produktu (ja nepieciešams, pēc suspendēšanas vai emulģēšanas ūdenī) vai jebkura organiskā šķīdinātāja sastāvā. Ja izmanto organisku šķīdinātāju, tas jālieto minimāli un jāiztvaicē no augsnes kolonnas virsmas pirms izskalošanas procedūras uzsākšanas. Cietie sintezētie produkti, piem., granulas, jāizmanto cietā veidā, bez ūdens, lai tie vienmērīgāk izklātos pa augsnes kolonnas virsmu, sintezētos produktus pirms lietošanas var samaisīt ar nelielu daudzumu kvarca smilšu (piem., 1 g).

24. Testējamās ķīmiskās vielas apjomam, ar ko apstrādā augsnes kolonnas, jābūt pietiekamam, lai varētu detektēt vismaz 0,5 % ievietotās devas katrā atsevišķajā segmentā. Aktīvām ķīmiskajām vielām augu aizsardzības līdzekļos var piemērot maksimālo ieteicamo lietošanas devu (vienreizējās lietošanas devu), un gan pamata izskalojumiem, gan nostādinātiem izskalojumiem testējamās ķīmiskās vielas apjoms ir jāsaista ar izmantoto augsnes kolonnas virsmas platību ([1]).

Ķīmiskās standartvielas

25. Izskalošanās eksperimentos izmanto standartvielas (sk. 12. punktu). Ar tām apstrādā augsnes kolonnas virsmu līdzīgi kā ar testējamajām ķīmiskajām vielām un atbilstošā daudzumā, lai varētu nodrošināt pietiekamu detektēšanu, pamatojoties uz iekšēju standartu un kopā ar testējamo ķīmisko vielu tajā

([1]) Apjomu, ar ko apstrādā cilindriskas augsnes kolonnas, var aprēķināt pēc šādas formulas:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

kur:

M = apjoms, ar ko apstrādā katru kolonnu [μg];

A = apstrādes deva [$kg \cdot ha^{-1}$];

d = augsnes kolonnas diametrs [cm];

π = 3,14.

▼M6

pašā augsnes kolonnā, vai arī vienu pašu atsevišķā augsnes kolonnā. Vislabāk ir izmantot abas ķīmiskās vielas vienā un tajā pašā kolonnā, ja vien tās nav līdzīgi marķētas.

Augsnes

Augsnes izvēle

26. Izskalošanās pētījumiem, izmantojot testējamās ķīmiskās vielas, izvēlas no trīs līdz četrām augsnēm ar atšķirīgu pH, organiskā oglekļa saturu un konsistenci (12). Norādījumi par augsnes izvēli izskalošanās eksperimentiem ir iekļauti turpmākajā 1. tabulā. Jonizējamām testējamajām ķīmiskajām vielām jāizvēlas augsnes ar plašu pH diapazonu, lai varētu novērtēt ķīmiskās vielas mobilitāti jonizētā un nejonizētā formā; vismaz trim augsnēm ir nepieciešams pH līmenis, kurā testējamā ķīmiskā viela mobilā formā.

1. tabula.

Norādījumi augsnes izvēlei izskalošanās pētījumos

Augsnes Nr.	pH vērtība	Organiskais ogleklis %	Māla saturs %	Konsistence (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	viegls māls
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	viegls smilšmāls
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	smilšmāls
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	mālsmilts
5	< 4,5	> 10 #	< 10	mālsmilts/smilts

(*) Saskaņā ar PLO un ASV Lauksaimniecības departamenta sistēmām (14).
§ Ieteicams, ka attiecīgās mainīgās vērtības iekļaujas dotajā diapazonā. Tomēr, ja rodas grūtības atrast piemērotu augsnes materiālu, ir pieņemamas vērtības, kas nesasniedz norādīto minimumu.
‡ Augsnes ar mazāk nekā 0,3 % organiskā oglekļa var izjaukt korelāciju starp organisko saturu un adsorbciju. Tādēļ ieteicams izmantot augsnes ar minimālo organiskā oglekļa saturu 0,3 %.
# Augsnes ar ļoti augstu oglekļa saturu (piem., > 10 %) var būt nepieņemamas juridisku iemeslu dēļ, piem., pesticīdu reģistrācijas nolūkā.

27. Dažkārt var būt nepieciešami citi augsnes tipi, lai pārstāvētu vēsākus, mērenās joslas un tropu reģionus. Tādēļ, izvēloties citus augsnes tipus, tie jāraksturo ar tiem pašiem parametriem, un tiem ir nepieciešamas līdzīgas raksturlielumu variācijas, kā augsnes tipiem, kas minēti norādījumos par augsnes izvēli izskalošanās pētījumiem (sk. iepriekš 1. tabulu), pat ja tie precīzi neatbilst kritērijiem.

28. Izskalošanās pētījumos ar "izturētām atliekām" izmanto vienu augsni (12). Tai nepieciešams smilts saturs, kas > 70 %, un organiskā oglekļa saturs 0,5–1,5 % (piem., 4. augsne 1. tabulā). Var izmantot arī citus augsnes tipus, ja svarīgi ir dati par reakciju produktiem.

29. Visas augsnes ir jāraksturo vismaz attiecībā uz konsistenci [% smilts, % nogulumu, % māla saskaņā ar PLO un ASV Lauksaimniecības departamenta klasifikācijas sistēmām (14)], pH, katjonu apmaiņas spēju, organiskā oglekļa saturu, tilpuma blīvumu (sajauktām augsnēm) un ūdens noturēšanas spēju. Mikroorganismu biomasas mērījumi ir nepieciešami tikai augsnei, ko

▼M6

izmanto nostādināšanas/inkubācijas periodā pirms nostādināto izskalojumu eksperimenta. Informācija par augsnes papildu īpašībām (piem., augsnes klasifikāciju, māla mineraloģiju un īpašo virsmas platību) var noderēt, interpretējot šā pētījuma rezultātus. Augsnes īpašību noteikšanai var izmantot metodes, kas ieteiktas atsaucēs (15)(16)(17)(18)(19).

Augsnes savākšana un uzglabāšana

30. Augšņu paraugi jāpaņem no augšējā slāņa (A horizonta) ne dziļāk par 20 cm. Veģetācijas paliekas, makrofauna un akmeņi ir jānovāc. Augsnes paraugiem (izņemot tos, ko izmanto testējamās ķīmiskās vielas nostādināšanai) ļauj izžūt istabas temperatūrā (vislabāk 20–25 °C). Irdināšana jāizdara ar minimālu spēku, lai augsnes sākotnējā struktūra mainītos iespējami mazāk. Augsnes paraugus izsijā caur ≤ 2 mm sietu. Ir ieteicams augsni rūpīgi homogenizēt, jo tas uzlabo rezultātu atkārtojamību. Pirms lietošanas augsnes paraugus var uzglabāt apkārtējās vides temperatūrā un turēt sausus (12). Uzglabāšanas laikam netiek noteikti nekādi ierobežojumi, taču, ja augsni uzglabā ilgāk par trim gadiem, tā pirms lietošanas atkārtoti jāanalizē attiecībā uz organiskā oglekļa saturu un pH.

31. Jānodrošina sīka vēsturiskā informācija par vietām, kurās testa augšņu paraugi paņemti. Šī informācija ietver precīzu atrašanās vietu [kas precīzi definēta ar *UTM* (Universālo transversālo Merkatora projekciju/Eiropas horizontālo atskaites sistēmu) vai ģeogrāfiskajām koordinātēm], veģetācijas segu, apstrādi ar ķīmiskajiem kultūraugu aizsardzības līdzekļiem, apstrādi ar organisko un neorganisko mēslojumu, bioloģisko materiālu vai nejauša piesārņojuma piedevas (12). Ja iepriekšējo četru gadu laikā augsne ir apstrādāta ar testējamo ķīmisko vielu vai tās strukturālajiem analogiem, šādu augsni nedrīkst izmantot izskalošanās pētījumos.

Testēšanas apstākļi

32. Testēšanas perioda laikā augsnes izskalošanās kolonnas jātur tumsā apkārtējās vides temperatūrā, kamēr vien šī temperatūra tiek uzturēta diapazonā ± 2 °C. Ieteicamā temperatūra ir no 18 līdz 25 °C.

33. Augsnes kolonnu virsmu nepārtraukti laista ar "mākslīgo lietu" (0,01 M $CaCl_2$), kura daudzums ir 200 mm 48 stundu laikā ([1]); šis rādītājs ir līdzvērtīgs 251 ml, ar ko apstrādā kolonnu, kuras iekšējais diametrs ir 4 cm. Ja testa nolūkiem nepieciešams, papildus var izmantot citu "mākslīgā lietus" daudzumu un ilgāku periodu.

Testa norise

Izskalošanās ar izcelsmes testējamo ķīmisko vielu

34. Sagatavo vismaz divas vienādas izskalošanās kolonnas ar neapstrādātu, izžuvušu un izsijātu augsni (< 2 mm), un to augstums ir aptuveni 30 cm. Lai pildījums būtu vienveidīgs, augsni kolonnās iepilda pa nelielām porcijām ar karoti un piespiež ar virzuli, vienlaikus viegli vibrējot kolonnu, līdz brīdim, kamēr augsnes kolonnas augšgals vairs neiegrimst. Vienveidīga iepildīšana ir

([1]) Tas modelē ārkārtīgi spēcīgu lietusgāzi. Piemēram, vidējais nokrišņu daudzums gadā Centrāleiropā ir aptuveni 800–1 000 mm.

▼M6

nepieciešama, lai no izskalošanās kolonnām iegūtu atkārtojamus rezultātus. Informācija par kolonnu sagatavošanas paņēmieniem ir atrodama atsaucēs (20)(21)(22). Lai varētu kontrolēt iepildīšanas procedūras atkārtojamību, nosaka kolonnās iepildītās augsnes kopējo svaru ([1]); dubulto kolonnu svaram ir jābūt līdzīgam.

35. Pēc iepildīšanas augsnes kolonnas sākotnēji samitrina ar "mākslīgo lietu" (0,01 M $CaCl_2$) no apakšas uz augšu, lai ar ūdeni izspiestu gaisu no augsnes porām. Pēc tam augsnes kolonnām ļauj uzbriest, un lieko ūdeni notecina smaguma spēks. Kolonnas piesātināšanas metodes ir apskatītas atsaucē (23).

36. Tad augsnes kolonnas apstrādā ar testējamo ķīmisko vielu un/vai standartvielu (sk. arī 23.–25. punktu). Lai nodrošinātu homogēnu izkliedi, testējamās ķīmiskās vielas un/vai standartvielas šķīdumus, suspensijas vai emulsijas vienmērīgi uzklāj uz augsnes kolonnu virsmas. Ja testējamās ķīmiskās vielas piemērošanai ir ieteicama iestrādāšana augsnē, tā jāsamaisa ar nelielu daudzumu (piem., 20 g) augsnes un jāuzklāj uz augsnes kolonnas virsmas.

37. Tad augsnes kolonnu virsmas pārklāj ar stikla plāvas disku, stikla pērlēm, stikla šķiedras filtriem vai apaļu filtrpapīru, lai vienmērīgi izkliedētu "mākslīgo lietu" pa visu virsmu un novērstu augsnes virskārtas bojājumus, ko izraisa lietus lāses. Jo lielāks kolonnas diametrs, jo lielāka rūpība nepieciešama augsnes kolonnu apstrādē ar "mākslīgo lietu", lai nodrošinātu "mākslīgā lietus" vienmērīgu izkliedēšanu pa augsnes virskārtu. Pēc tam augsnes kolonnas pilienu veidā apstrādā ar "mākslīgo lietu", izmantojot virzuli vai peristaltisko sūkni, vai pilināmo piltuvi. Izskalojumus vislabāk savākt pa frakcijām un reģistrēt to attiecīgos tilpumus ([2]).

38. Pēc izskalošanās un kolonnu notecināšanas augsnes kolonnas sadala segmentos, kuru skaits atkarīgs no pētījumā iegūstamās informācijas apjoma, tad segmentus ekstrahē ar piemērotiem šķīdinātājiem vai šķīdinātāju maisījumiem un analizē datus par testējamo ķīmisko vielu un, ja nepieciešams, reakciju produktiem, kopējo radioaktivitāti un standartvielu. Izskalojumu vai izskalojumu frakciju analīzi veic tieši vai pēc ekstrakcijas par tām pašām vielām. Izmantojot radioaktīvi marķētas testējamās ķīmiskās vielas, jāidentificē visas frakcijas, kas satur ≥ 10 % piemērotās radioaktivitātes.

Izskalošanās ar izturētām atliekām

39. Svaigu augsni (iepriekš nežāvētu) apstrādā ar radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu ar ātrumu, kas atbilst augsnes kolonnu virsmas platībai (sk. 24. punktu), un inkubē aerobos apstākļos saskaņā ar C.23. testēšanas metodi (13). Inkubācijas (izturēšanas) periodam jābūt pietiekami ilgam, lai radītu

([1]) Tilpuma blīvuma piemēri izjauktām augsnēm ir šādi:smilts augsnei 1,66 g · ml^{-1};
mālsmilts augsnei 1,58 g · ml^{-1};
smilšmāla augsnei 1,17 g · ml^{-1};
nogulumu augsnei 1,11 g · ml^{-1}.

([2]) Tipiskie izskalojumu tilpumi ir diapazonā 230–260 ml, kas atbilst aptuveni 92–104 % kopējā piemērotā "mākslīgā" lietus (251 ml), ja izmanto augsnes kolonnas ar 4 cm diametru un 30 cm garumu.

▼M6

būtiskus reakciju produktu apjomus; ieteicams izturēšanas periods, kas atbilst testējamās ķīmiskās vielas vienam pussabrukšanas periodam ([1]), bet tas nedrīkst pārsniegt 120 dienas. Pirms izskalošanās izturētajā augsnē analizē testējamās ķīmiskās vielas un tās reakciju produktu klātbūtni.

40. Izskalošanās kolonnas piepilda 28 cm augstumā ar to pašu augsni (bet izžuvušu), kas tika izmantota 34. punktā aprakstītajā izturēšanas eksperimentā, un nosaka arī piepildīto augsnes kolonnu kopējo svaru. Tad augsnes kolonnas sākotnēji samitrina, kā minēts 35. punktā.

41. Pēc tam ar testējamo ķīmisko vielu un tās reakciju produktiem apstrādā augsnes kolonnu virsmu, ko veido izturētas augsnes atliekas (sk. 39. punktu) 2 cm biezā augsnes segmentā. Augsnes kolonnu kopējam augstumam (neapstrādātā augsne + nostādinātā augsne) nebūtu jāpārsniedz 30 cm (sk. 34. punktu).

42. Izskalošanu veic tā, kā aprakstīts 37. punktā.

43. Pēc izskalošanās augsnes segmentus un izskalojumus saskaņā ar 38. punktu analizē attiecībā uz testējamo ķīmisko vielu, tās reakciju produktu klātbūtni un neekstrahēto radioaktivitāti. Lai noteiktu, cik daudz izturēto atlieku ir palicis augšējā 2 cm slānī pēc izskalošanās, šo segmentu analizē atsevišķi.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

44. Testējamās ķīmiskās vielas, tās reakciju produktu, neekstrahējamo vielu un, ja iekļauta, arī standartvielas apjomus norāda procentos no izmantotās sākotnējās devas katram augsnes segmentam un izskalojumu frakcijai. Par katru kolonnu ir jāiesniedz grafisks attēls, atzīmējot konstatētos procentus, atkarībā no augsnes dziļuma.

45. Ja šajos kolonnas izskalošanās pētījumos ir iekļauta standartviela, minētās ķīmiskās vielas izskalošanos var novērtēt salīdzinošā griezumā, izmantojot relatīvās mobilitātes koeficientus (*RMF*; definīciju sk. 3. papildinājumā) (1)(11), kas ļauj salīdzināt dažādu ķīmisko vielu izskalošanās datus, kas iegūti no dažādiem augsnes tipiem. Piemēri par *RMF* vērtībām daudziem ķīmiskajiem kultūraugu aizsardzības līdzekļiem ir iekļauti 3. papildinājumā.

46. Aplēses par K_{oc} (organiskā oglekļa normalizēto adsorbcijas koeficientu) un K_{om} (organisko vielu normalizēto izkliedes koeficientu) var iegūt arī no kolonnas izskalošanās rezultātiem, pamatojoties uz vidējo izskalošanās attālumu vai noteiktajām sakarībām starp *RMF* un attiecīgi K_{om} vai K_{oc} (4) vai piemērojot vienkāršās hromatogrāfijas teoriju (24). Tomēr otrā metode ir jāizmanto piesardzīgi, jo īpaši ņemot vērā, ka izskalošanās process attiecas ne tikai uz piesātinātas plūsmas apstākļiem, bet drīzāk uz nepiesātinātām sistēmām.

([1]) Augsnē var izveidoties vairāk nekā viens galvenais reakciju produkts, un tas var parādīties arī reakciju pētījuma dažādos laika punktos. Šādos gadījumos var būt nepieciešami izskalošanās pētījumi ar dažāda vecuma izturētām atliekām.

▼M6

Rezultātu interpretēšana

47. Šajā metodē raksturotie kolonnas izskalošanās pētījumi ļauj noteikt testējamās ķīmiskās vielas (galvenajā izskalošanās pētījumā) un/vai tās reakciju produktu (izturēto atlieku izskalošanās pētījumā) izskalošanās jeb mobilitātes potenciālu augsnē. Šie testi nesniedz kvantitatīvas prognozes par izskalošanās gaitu lauka apstākļos, taču tos var izmantot, lai salīdzinātu vienas ķīmiskās vielas "izskalojamību" ar citām ķīmiskajām vielām, kuru izskalošanās parametri var būt zināmi (24). Tāpat, tie kvantitatīvi nemēra izmantotās ķīmiskās vielas procentuālo īpatsvaru, kas var sasniegt gruntsūdeņus (11). Tomēr kolonnas izskalošanās pētījumu rezultāti var palīdzēt pieņemt lēmumu par to, vai ir jāveic papildu testēšana puslauka vai lauka apstākļos ķīmiskajām vielām ar augstu mobilitātes potenciālu laboratorijas testos.

Testēšanas pārskats

48. Testēšanas pārskatā jābūt iekļautai šādai informācijai.

Testējamā ķīmiskā viela un standartviela (ja tiek lietota):

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums (*IUPAC* un *CAS* nomenklatūrā), *CAS* numurs, ķīmiskā struktūra (norādot marķējuma pozīciju, ja izmanto radioaktīvi marķētu materiālu) un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— testējamās ķīmiskās vielas tīrība (piemaisījumi);

— marķētās ķīmiskās vielas radioķīmiskā tīrība un īpatnējā aktivitāte (attiecīgā gadījumā).

Testa augsnes:

— informācija par savākšanas vietu;

— augšņu īpašības, piem., pH, organiskā oglekļa un māla saturs, konsistence un tilpuma blīvums (sajauktām augsnēm);

— augsnes mikrobiālā aktivitāte (tikai augsnei, ko izmanto testējamās ķīmiskās vielas nostādināšanai);

— augsnes uzglabāšanas ilgums un uzglabāšanas apstākļi.

Testēšanas apstākļi:

— pētījumu norises datumi;

— izskalošanās kolonnu garums un diametrs;

— kopējais augsnes svars augsnes kolonnās;

— testējamās ķīmiskās vielas un, ja attiecināms, standartvielas izmantotais apjoms;

— piemērotā "mākslīgā lietus" apjoms, biežums un ilgums;

— eksperimentālā veidojuma temperatūra;

— replikātu skaits (vismaz divi);

— testējamās ķīmiskās vielas, tās reakciju produktu un, ja attiecināms, standartvielas analīzes metodes dažādos augsnes segmentos un izskalojumos;

— reakciju produktu raksturošanas un identificēšanas metodes augsnes segmentos un izskalojumos.

▼**M6**

Testa rezultāti:

— tabulas ar rezultātiem, kas izteikti kā koncentrācijas un piemērotās devas procentuālie īpatsvari augsnes segmentos un izskalojumos;

— masas bilance, ja attiecināma;

— izskalojumu tilpumi;

— izskalošanās attālumi un, ja attiecināms, relatīvie mobilitātes koeficienti;

— augsnes segmentos konstatēto procentu grafisks attēlojums, salīdzinājumā ar augsnes segmentu dziļumu;

— rezultātu novērtējums un interpretācija.

LITERATŪRA

(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) Annex I to 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, OJ L 172, 22.7.1995, p.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 soil, 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) Šā pielikuma nodaļas:

A.4. nodaļa: Tvaika spiediens;

A.6. nodaļa: Šķīdība ūdenī;

▼**M6**

A.8. nodaļa: Sadalījuma koeficients, kolbu kratīšanas metode;

A.24. nodaļa: Sadalījuma koeficients, *HPLC* metode;

C.7. nodaļa: Noārdīšanās –abiotiska noārdīšanās hidrolīze atkarībā no pH

C.18. nodaļa: Adsorbcija/desorbcija ar partijas līdzsvara metodi.

C.23. nodaļa: Aerobā un anaerobā pārvēršanās augsnē.

(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. papildinājums

Definīcijas un mērvienības

Izturētas augsnes atliekas – testējamā ķīmiskā viela un tās reakciju produkti, kas atrodas augsnē pēc to piemērošanas un pēc pietiekami ilga laikposma, lai varētu nodrošināt transporta, adsorbcijas, metabolisma un izkliedes procesus, pārveidojot sadalījuma un dažu izmantoto ķīmisko vielu ķīmisko raksturu (1).

Mākslīgais lietus – 0,01 M $CaCl_2$ šķīdums destilētā vai dejonizētā ūdenī.

Vidējais izskalošanās attālums – augsnes sekcijas apakšdaļa, kurā kumulatīvā atgūtā ķīmiskā viela = 50 % kopējās atgūtās testējamās ķīmiskās vielas apjoma [parastā izskalošanās eksperimentā], vai (augsnes sekcijas apakšdaļa, kurā kumulatīvā atgūtā ķīmiskā viela = 50 % kopējās atgūtās testējamās ķīmiskās vielas apjoma) – ((izturēto atlieku slāņa biezums)/2) [izturēto atlieku izskalošanās pētījumā].

Ķīmiskā viela – viela vai maisījums.

Izskalojums – ūdens fāze, kas izkāsta caur augsnes profilu vai augsnes kolonnu (1).

Izskalošanās – process, kurā ķīmiskā viela pārvietojas virzienā uz leju caur augsnes profilu vai augsnes kolonnu (1).

Izskalošanās attālums – dziļākais augsnes segments, kurā pēc izskalošanās procesa konstatē $\geq$ 0,5 % izmantotās testējamās ķīmiskās vielas vai izturēto atlieku (līdzvērtīgs iespiešanās dziļumam).

Detektēšanas robeža *(LOD)* un **kvantitatīvās noteikšanas robeža *(LOQ)*** – detektēšanas robeža *(LOD)* ir ķīmiskās vielas koncentrācija, zem kuras vielas identitāte nav atšķirama no analītiskiem artefaktiem. Kvantitatīvās noteikšanas robeža *(LOQ)* ir ķīmiskās vielas koncentrācija, zem kuras tā nav nosakāma ar pieņemamu precizitāti.

***RMF* relatīvās mobilitātes koeficients** – (testējamās ķīmiskās vielas izskalošanās attālums (cm))/(standartvielas izskalošanās attālums (cm)).

Testējamā ķīmiskā viela – jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

Reakcijas produkts – jebkura ķīmiska viela, kas iegūta testējamās vielas biotiskās vai abiotiskās ķīmiskajās reakcijās, tostarp CO_2 un produkti, kas ir saistīti atliekās.

Augsne – minerālo un organisko ķīmisko sastāvdaļu maisījums, ar augstu oglekļa un slāpekļa saturu un lielu molekulsvaru, kuru apdzīvo nelieli organismi (galvenokārt mikroorganismi). Augsni var iedalīt divās grupās:

— neskarta augsne, kāda tā laika gaitā ir izveidojusies raksturīgos dažādu augšņu tipu slāņos;

— sajaukta augsne, kāda tā parasti ir atrodama aramlaukos vai kāda izveidojas, ja rokot vāc paraugus un izmanto šajā testēšanas metodē (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

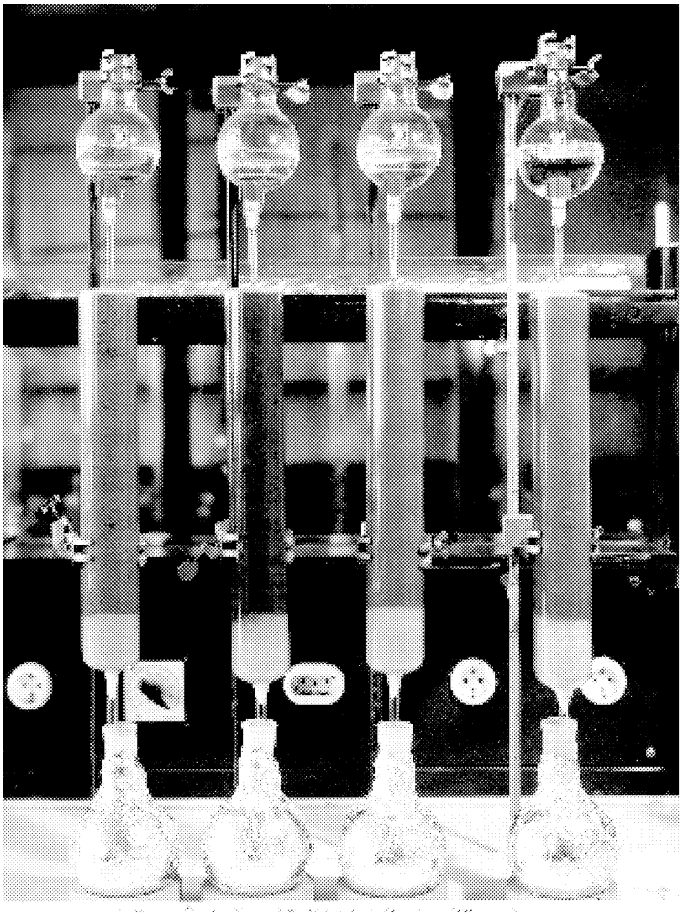
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼M6

2. papildinājums

1. attēls.

Piemērs: no stikla izgatavotas un sekcijās nesadalāmas izskalošanās kolonnas, kuru garums 35 cm un iekšējais diametrs 5 cm (1)



← Pilināmās piltuves "mākslīgā lietus" izmantošanai

← Stikla plāvas disks augsnes virskārtas bojājumu novēršanai un "mākslīgā lietus" vienmērīgai izkliedēšanai

← Stikla kolonna, kas piepildīta ar testējamo augsni (testējot fotolabilus produktus, kolonnas ietin alumīnija folijā)

← Kvarca smilšu slānis

← Stikla vates spraudnis augsnes noturēšanai kolonnā

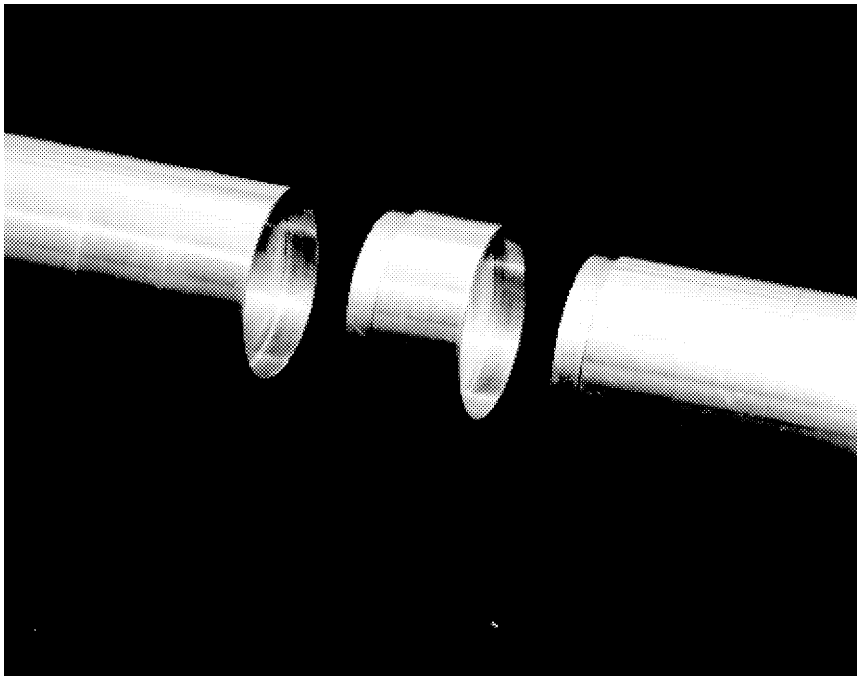
← Kolba ar apaļu dibenu izskalojumu savākšanai; ietīta alumīnija folijā fotolīzes novēršanai

(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**

2. attēls.

Sekcijās sadalāmu metāla kolonnu ar 4 cm iekšējo diametru (1) piemērs



(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. papildinājums

Relatīvās mobilitātes koeficientu (*) (*RMF*) piemēri dažādiem ķīmiskajiem kultūraugu aizsardzības līdzekļiem (1)(2) un atbilstošās mobilitātes klases (+)

RMF diapazons	Ķīmiskā viela *(RMF)*	Mobilitātes klase
≤ 0,15	Parations (< 0,15), flurodifēns (0,15)	I nemobila
0,15 – 0,8	Profenofoss (0,18), propikonazols (0,23), diazinons (0,28), diurons (0,38), terbutilazīns (0,52), metidations (0,56), prometrīns (0,59), propazīns (0,64), alahlors (0,66), metolahlors (0,68)	II viegli mobila
0,8 – 1,3	Monurons (**) (1,00), atrazīns (1,03), simazīns (1,04), fluometurons (1,18)	III mēreni mobila
1,3 – 2,5	Prometons (1,67), cianazīns (1,85), bromacils (1,91), karbutilāts (1,98)	IV diezgan mobila
2,5 – 5,0	Karbofurāns (3,00), dioksakarbs (4,33)	V mobila
> 5,0	Monokrotofoss (> 5,0), dikrotofoss (> 5,0)	VI ļoti mobila

(*) Relatīvās mobilitātes koeficientu atvasina šādi (3):

$$RMF = \frac{\text{testējamās ķīmiskās vielas izskalošanās attālums(cm)}}{\text{standartvielas izskalošanās attālums.(cm)}}$$

(**) Standartviela.

\+ Citas sistēmas ķīmisko vielu mobilitātes augsnē klasificēšanai balstās uz R_f vērtībām, kas iegūtas augsnes plānslāņa hromatogrāfijā (4), un uz K_{oc} vērtībām (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. **APLĒSE PAR EMISIJĀM VIDĒ NO KOKSNES, KAS APSTRĀDĀTA AR KONSERVANTIEM: LABORATORIJAS METODE SASKARĒ AR SALDŪDENI VAI JŪRAS ŪDENI ESOŠIEM KOKA IZSTRĀDĀJUMIEM BEZ PĀRKLĀJUMA**

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 313 (2007. gads). Lai attiecībā uz koksni, kas apstrādāta ar konservantiem, varētu izdarīt vides riska novērtējumu, ir kvantitatīvi jānosaka emisijas, kas no apstrādātās koksnes nonāk vidē. Šī testēšanas metode ir laboratorijas metode, ar kuru emisijas no koksnes, kas apstrādāta ar konservantu, novērtē divās situācijās, kurās emisijas var nokļūt vidē:

— emisijas no apstrādātas koksnes, kas atrodas saskarē ar saldūdeni. Emisijas no apstrādātās koksnes virsmas var iekļūt ūdenī;

— emisijas no apstrādātas koksnes, kas atrodas saskarē ar jūras ūdeni. Emisijas no apstrādātās koksnes virsmas var iekļūt jūras ūdenī.

2. Šīs testēšanas metodes mērķis ir testēt emisijas no koksnes un koka izstrādājumiem, kam nav pārklājuma un kas atrodas saskarē ar saldūdeni vai jūras ūdeni. Starptautiski izmanto lietojuma klases, kas kategorizē bioloģisko apdraudējumu, kurš var rasties apstrādātajai precei. Lietojuma klašu klasifikācijā arī definēts, kādās situācijās apstrādāto preci lieto, un noteikts, kādus vides segmentus (gaiss, ūdens, augsne) ar konservantu apstrādātā koksne potenciāli apdraud.

3. Šī testēšanas metode ir laboratorijas procedūra paraugu (emisāta) iegūšanai no ūdens, kuru lieto apstrādātās koksnes iemērkšanai arvien ilgākos starplaikos pēc ekspozīcijas. Emisijas daudzums emisātā ir atkarīgs no koksnes virsmas platības un ekspozīcijas ilguma, to aplēš kā plūsmu mg/m^2/dienā. Tā var aplēst plūsmu (izskalošanās ātrumu) pēc arvien ilgākiem ekspozīcijas periodiem.

4. Emisijas daudzumu var izmantot apstrādātās koksnes vides riska novērtēšanā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Pieņem, ka mehānisms, kā notiek izskalošanās no koksnes virsmas, pēc rakstura un smaguma saldūdenim nav vienāds ar jūras ūdeni. Tādēļ attiecībā uz tādiem koksnes konservēšanas līdzekļiem vai maisījumiem, ko lieto jūras ūdens vidē izmantotas koksnes apstrādei, nepieciešams koksnes izskalošanās pētījums attiecībā uz jūras ūdeni.

6. Koksnei, proti, ar koksnes konservantu apstrādātai koksnei jābūt reprezentatīvai attiecībā uz tirdzniecībā pieejamo koksni. Tā jāapstrādā saskaņā ar konservanta ražotāja norādījumiem un atbilstoši attiecīgajiem standartiem un specifikācijām. Jānorāda koksnes pēcapstrādes nogatavināšanas parametri pirms testa uzsākšanas.

7. Izmantotajiem koksnes paraugiem jābūt reprezentatīviem attiecībā uz lietotajām precēm (piemēram, koku sugām, koksnes blīvumam un citām īpašībām).

▼M6

8. Koksnei šo testu var izmantot, ja lieto iespiešanās tehnoloģiju vai uzklāšanu uz virsmas, un to var izmantot arī apstrādātai koksnei, kurai virsma obligāti jāapstrādā papildus (piemēram, komerciālā lietošanā ir prasība, lai virsma būtu krāsota).

9. Koksnes emisiju kvantitātes, satura un rakstura noteikšanā svarīgs ir ūdens sastāvs, daudzums, pH un fizikālais veids.

TESTĒŠANAS METODES PRINCIPS

10. Testējot ar konservantu apstrādātu koksni, paraugus mērcē ūdenī. Ūdeni (emisātu) ekspozīcijas periodā vairākas reizes ievāc un ķīmiski analizē tik ilgā ekspozīcijas periodā, ar kuru pietiek statistiskajiem aprēķiniem. No analīžu rezultātiem aprēķina emisijas ātrumus mg/m^2 dienā. Paraugu ņemšanas periodi jāatzīmē. Ja pirmajos trijos datu punktos fonu nekonstatē, testus ar neapstrādātiem paraugiem var beigt.

11. Iekļaujot neapstrādātas koksnes paraugus, var noteikt tādu koksnes emisātu fona līmeņus, kas nav lietotais konservants.

KVALITĀTES KRITĒRIJI

Pareizība

12. Emisijas novērtēšanas testēšanas metodes pareizība ir atkarīga no tā, vai testējamie paraugi reprezentē komerciāli apstrādātu koksni, no tā, cik ūdens reprezentē reālo ūdeni un cik ekspozīcijas režīms reprezentē dabiskos apstākļus.

13. Analīzes metodes pareizība, precizitāte un atkārtojamība jānosaka pirms testa veikšanas.

Reproducējamība

14. Ievāc un analizē trīs ūdens paraugus, un to vidējo vērtību atzīst par emisijas vērtību. Rezultātu reproducējamība vienā laboratorijā un starp dažādām laboratorijām ir atkarīga no mērcēšanas režīma un no testējamiem paraugiem izmantotās koksnes.

Pieņemamais rezultātu diapazons

15. Šajā testā pieņemams ir rezultātu diapazons, kurā augstākās un zemākās vērtības atšķiras par mazāk nekā vienu lieluma kārtu.

TESTĒŠANAS APSTĀKĻI

Ūdens

16. Saldūdens izskalošanās scenāriji – ja jānovērtē saldūdenim eksponēta koksne, izskalošanās testā ieteicams lietodejonizētu ūdeni (piemēram, ASTM D 1193, II tips). Ūdens temperatūrai jābūt 20 °C +/– 2 °C, un izmērīto pH un ūdens temperatūru atspoguļo testēšanas pārskatā. Analizējot izmantotā ūdens paraugus, kas ņemti pirms apstrādāto paraugu iemērkšanas, var aplēst analizēto ķīmisko vielu daudzumu ūdenī. Šis ir kontroles pasākums, kurā nosaka fona līmeņus ķīmiskajām vielām, kuras pēc tam ķīmiski analizē.

▼M6

17. Jūras ūdens izskalošanās scenāriji – ja jānovērtē jūras ūdenim eksponēta koksne, izskalošanās testā ieteicams lietot sintētisku jūras ūdeni (piemēram, ASTM D 1141, okeāna ūdens aizstājējs bez smagajiem metāliem). Ūdens temperatūrai jābūt 20 °C +/– 2 °C, un izmērīto pH un ūdens temperatūru atspoguļo testēšanas pārskatā. Analizējot izmantotā ūdens paraugus, kas ņemti pirms apstrādāto paraugu iemērkšanas, var aplēst analizējamo ķīmisko vielu saturu ūdenī. Šis ir kontroles pasākums, kurā analizē interesējošo ķīmisko vielu fona līmeņus.

Koksnes testā izmantojamie paraugi

18. Koku sugām jābūt tām koku sugām, kuras parasti lieto koksnes konservantu iedarbīguma testēšanai. Ieteicamas ir *Pinus sylvestris L*. (parastā priede), *Pinus resinosa Ait*. (sarkanā priede) vai *Pinus* spp (dienvidu priede). Papildu testiem var izmantot arī citas sugas.

19. Jālieto taisnšķiedras koksne bez māzeriem. Jāizvairās lietot materiālus ar sveķainu izskatu. Koksnei ir jābūt tādai, kāda parasti ir pieejama tirdzniecībā. Atspoguļo koksnes avotu, blīvumu un gadskārtu gredzenu skaitu uz 10 mm.

20. Testā ieteicams izmantot koka paraugus, kuri sastāv no blokiem, kas ir komplektā pa pieci, pēc izmēra atbilst EN 113 (25 mm x 50 mm x 15 mm) un kam gareniskās skaldnes ir paralēlas koksnes šķiedrai, lai gan var izmantot arī citus izmērus, piemēram, 50 mm × 150 mm × 10 mm. Testēšanas paraugs pilnībā jāiemērc ūdenī. Testēšanas paraugiem jāsastāv no 100 % aplievas. Katru paraugu unikāli marķē, lai to varētu identificēt visā testa gaitā.

21. Visiem testēšanas paraugiem jābūt ēvelētiem vai gareniski sazāģētiem, un to virsmas nedrīkst būt slīpētas.

22. Koksnes testā izmanto vismaz piecus paraugu komplektus: trīs paraugu komplektus apstrādā ar konservantu, vienu atstāj neapstrādātu un vēl viens ir paredzēts, lai aplēstu, kāds ir neapstrādātu testēšanas paraugu mitrumsaturs pēc žāvēšanas krāsnī. Sagatavo pietiekami daudzus testēšanas paraugus, lai varētu atlasīt trīs komplektus ar paraugiem, kam konservanta aizture ir 5 % robežās no visu testēšanas paraugu konservanta aiztures vidējās vērtības.

23. Visiem testēšanas paraugiem galus hermetizē ar ķīmisko vielu, kas novērš konservanta iespiešanos paraugu gala šķiedrās vai nepieļauj izskalošanos no paraugiem pa gala šķiedrām. Paraugiem, kuriem veic uzklāšanu uz virsmas, gala hermētiķi jālieto citādāk nekā paraugiem, kam izmanto iespiešanās tehnoloģiju. Gala hermētiķi pirms apstrādes jāizmanto tikai gadījumā, ja veic uzklāšanu uz virsmas.

24. Apstrādē ar iespiešanās tehnoloģiju gala šķiedrām jābūt atklātām. Tādēļ paraugu gali jāhermetizē nogatavināšanas perioda beigās. Emisiju aplēš tikai gareniskajam virsmas laukumam. Hermētiķi jāpārbauda un, ja nepieciešams, pirms izskalošanās ierosināšanas jālieto atkārtoti, un pēc izskalošanās ierosināšanas tos atkārtoti lietot nedrīkst.

▼M6

Mērcēšanas tvertne

25. Šo tvertni izgatavo no inerta materiāla, un tā ir pietiekami liela, lai tajā 500 ml ūdens varētu ievietot piecus EN113 koksnes paraugus, nodrošinot virsmas platības attiecību pret ūdens tilpumu 0,4 cm2/ml.

Testēšanas paraugu balstīšanas konstrukcija

26. Testēšanas paraugus balsta konstrukcijā, kas nodrošina, ka visas eksponētās parauga virsmas ir saskarē ar ūdeni.

PROCEDŪRA APSTRĀDEI AR KONSERVANTU

Apstrādāto testēšanas paraugu sagatavošana

27. Testēšanai paredzēto koksnes paraugu, ko testā apstrādās ar konservantu, apstrādā, izmantojot šim konservantam norādīto metodi, un tā var būt apstrāde ar iespiešanās tehnoloģiju vai virsmuzklāšanas tehnoloģija, kurā var izmantot iemērkšanu, aerosolu vai otu.

Konservanti, ar kuriem veic apstrādi ar iespiešanās tehnoloģiju

28. Sagatavo tādu konservanta šķīdumu, kas apstrādē ar iespiešanās tehnoloģiju panāks nepieciešamo uzņemšanu vai aizturi. Testēšanai paredzēto koksnes paraugu nosver un noteic tā izmērus. Apstrāde ar iespiešanās tehnoloģiju jāveic tā, kā paredzēts attiecībā uz 4. vai 5. lietojuma klases koksnes konservantu. Pēc apstrādes paraugu vēlreiz nosver, un konservanta aizturi (kg/m^3) aprēķina pēc šāda vienādojuma:

$$\frac{Masa\ pēc\ apstrādes\ (\mathrm{kg}) - Masa\ pirms\ apstrādes\ (\mathrm{kg})}{Testēšanas\ parauga\ tilpums\ (\mathrm{m}^3)} \times \frac{Šķīduma\ koncentrācija(\%\ masa/masa)}{100}$$

29. Jāņem vērā, ka šajā testā var izmantot rūpnieciskā apstrādes iekārtā (piemēram, ar vakuumspiediena piesūcināšanu) apstrādātus kokmateriālus. Atzīmē izmantotās procedūras, un analizē un atzīmē šādi apstrādātā materiāla aizturi.

Konservanti, ar kuriem veic apstrādi ar uzklāšanu uz virsmas

30. Uzklāšana uz virsmas notiek, testēšanai paredzētos koksnes paraugus iemērcot, apsmidzinot vai apstrādājot ar otu. Konservanta uzklāšanā uz virsmas jāievēro paredzētā procedūra un patēriņš (piemēram, $litri/m^2$).

31. Šādā gadījumā jāņem arī vērā, ka testā var izmantot rūpnieciskā apstrādes iekārtā apstrādātus kokmateriālus. Atzīmē lietotās procedūras, un analizē un atzīmē šādi apstrādātā materiāla aizturi.

Testēšanas paraugu nogatavināšana pēc apstrādes

32. Apstrādātie testēšanas paraugi ir jānogatavina saskaņā ar ieteikumiem, ko atbilstoši konservanta marķēšanas prasībām vai komerciālajai apstrādes praksei, vai standartam EN 252 standartam sniedzis testējamā konservanta piegādātājs.

▼M6

Testēšanas paraugu sagatavošana un atlase

33. Kad ir pabeigta pēcapstrādes nogatavināšana, aprēķina testēšanas paraugu grupas vidējo aizturi un izskalošanās mērījumu vajadzībām pēc nejaušības principa atlasa trīs reprezentatīvus paraugu komplektus, kuru aizture ir 5 % robežās no grupas vidējā rādītāja.

KONSERVANTA EMISIJU MĒRĪŠANAS PROCEDŪRA

Iemērkšanas metode

34. Testēšanas paraugus nosver un pēc tam pilnīgi iemērc ūdenī, pierakstot datumu un laiku. Tvertni pārsedz, lai samazinātu iztvaikošanu.

35. Ūdeni nomaina ar šādiem starplaikiem: 6 stundas, 1 diena, 2 dienas, 4 dienas, 8 dienas, 15 dienas, 22 dienas, 29 dienas (piezīme – norādīts ir kopējais laiks, nevis starplaiki). Reģistrē ūdens nomaiņas laiku un datumu un no tvertnes atgūtā ūdens masu.

36. Pēc katras ūdens nomaiņas turpmākai ķīmiskai analīzei ņem paraugu no ūdens, kurā testēšanas paraugu komplekti bija iemērkti.

37. Paraugu ņemšanas procedūra dod iespēju aprēķināt emisiju daudzuma profilu laika griezumā. Paraugus glabā analīta konservēšanai piemērotos apstākļos, piemēram, ledusskapī un tumsā, lai pirms analīzes paraugā nesavairotos mikroorganismi.

EMISIJAS MĒRĪŠANA

Apstrādātie paraugi

38. Ievākto ūdeni ķīmiski analizē attiecībā uz aktīvo vielu un/vai attiecīgajiem tās noārdīšanās/pārstrādāšanās produktiem, ja nepieciešams.

Neapstrādātie paraugi

39. Ūdens (emisāta) ievākšana šajā sistēmā un turpmāka to ķīmisko vielu analīze, kas izskalojušās no neapstrādātajiem koksnes paraugiem, dod iespēju aplēst neapstrādātai koksnei iespējamo konservanta emisijas ātrumu. Emisātu ievācot un analizējot pēc pakāpeniski pieaugošiem ekspozīcijas periodiem, var aplēst, kā emisijas ātrums mainās laikā. Šī analīze ir kontroles procedūra, kurā nosaka testējamās ķīmiskās vielas fona līmeņus neapstrādātā koksnē, lai apstiprinātu, ka paraugiem izmantotā koksne ar konservantu iepriekš nav apstrādāta.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Ķīmiskās analīzes

40. Ievākto ūdeni ķīmiski analizē, un ūdens analīžu rezultātus izsaka piemērotās mērvienībās, piemēram, µg/l.

Datu ziņošana

41. Visus rezultātus atzīmē. Papildinājumā ir dots piemērs ar iespējamu atzīmēšanas veidlapu vienam apstrādātu testa paraugu komplektam, kā arī kopsavilkuma tabula vidējo emisijas vērtību aprēķināšanai katrā paraugu ņemšanas intervālā.

42. Vienas dienas emisijas plūsmu mg/m^2/dienā aprēķina, izmantojot triju mērījumu vidējo rādītāju trijos replikātos un izdalot to ar mērcēšanas dienu skaitu.

▼M6

Testēšanas pārskats

43. Testēšanas pārskatā jāsniedz vismaz šāda informācija:

— testējamā konservanta piegādātāja nosaukums;

— testējamā konservanta specifiskais un unikālais nosaukums vai kods;

— aktīvās(-o) sastāvdaļas(-u) tirdzniecības nosaukums vai vispārpieņemtais nosaukums ar vispārīgu aprakstu par papildvielām (piemēram, papildu šķīdinātājs, sveķi) un sastāvs, kas izteikts kā sastāvdaļu % m/m;

— attiecīgā aizture vai slodze (attiecīgi kg/m^3 vai l/m^2), kas norādīta saskarē ar ūdeni lietotai koksnei;

— izmantotās koku sugas, norādot blīvumu un pieauguma ātrumu gadskārtu gredzenos uz 10 mm;

— testējamā konservanta slodze vai aizture un formula, ar kuru aizturi aprēķina, izsakot l/m^2 vai kg/m^3;

— konservanta lietošanas paņēmiens, iespiešanās tehnoloģijas gadījumā norādot apstrādes laika grafiku un virsmas apstrādes tehnoloģijas gadījumā – uzklāšanas metodi;

— konservanta lietošanas datums un aplēse par testēšanas paraugu mitrumsaturu, kas izteikts procentos;

— izmantotās nogatavināšanas procedūras, norādot veidu, apstākļus un ilgumu;

— norāde par izmantoto koksnes galu hermētiķi un cikreiz tas izmantots;

— norāde par jebkuru turpmāko koksnes apstrādi, piemēram, norāde par krāsvielu piegādātāju, krāsas veidu, īpašībām un krāsas slodzi;

— katra mērcējuma laiks un datums, ūdens daudzums, ko katrā mērcējumā izmanto testēšanas paraugu mērcēšanai un ūdens daudzums, ko koksne uzsūc mērcēšanas laikā;

— jebkāda atkāpe no aprakstītās metodes, un jebkādi apstākļi, kas varējuši ietekmēt rezultātus.

LITERATŪRA

(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. papildinājums

Testēšanas metodes atzīmēšanas veidlapa

Aplēse par emisijām vidē no koksnes, kas apstrādāta ar konservantiem: laboratorijas metode saskarē ar saldūdeni vai jūras ūdeni esošiem koka izstrādājumiem bez pārklājuma

Testēšanas vieta	

Koksnes konservants

Konservanta piegādātājs	
Konservanta specifiskais un unikālais nosaukums vai kods	
Konservanta tirdzniecības nosaukums vai vispārpieņemtais nosaukums	
Papildvielas	
Saskarē ar ūdeni lietotās koksnes attiecīgā aizture	

Lietošana

Lietošanas metode	
Lietošanas datums	
Aiztures aprēķināšanai izmantotā formula	
Nogatavināšanas procedūra	
Nogatavināšanas ilgums	
Galu hermētiķis/ cik reizes lietots	
Pēcapstrāde	attiecīgā gadījumā

Testēšanas paraugi

Koku sugas	
Koksnes blīvums	(minimālais … vidējā vērtība … maksimālais)
Pieauguma ātrums (gadskārtu gredzeni uz 10 mm)	(minimālais … vidējā vērtība … maksimālais)
Mitrumsaturs	

▼**M6**

Testa kompleksi (*)	**Aizture (piemēram, kg/m^3)**
Apstrādāts “x”	Vidējā vērtība un standartnovirze vai diapazons pieciem paraugiem
Apstrādāts “y”	Vidējā vērtība un standartnovirze vai diapazons pieciem paraugiem
Apstrādāts “z”	Vidējā vērtība un standartnovirze vai diapazons pieciem paraugiem
Neapstrādāts	
Testēšanas metodes parametru mainība	piemēram, ūdens kvalitāte, testēšanas paraugu izmēri utt.

(*) x, y un z pārstāv trīs replicētus paraugus.

▼M6

Laiks	Ūdens nomaiņa	Parauga masa		Uzņemtais ūdens		Ūdens paraugs				
		Apstrādāts (vidēji)	Neapstrādāts	Apstrādāts (vidēji)	Neapstrādāts		Testēšanas ūdens	x	y	z
	Datums	g	g	g	g	Nr.	pH	pH	pH	pH
Sākums										
6 stundas						1.				
24 stundas						2.				
2 dienas						3.				
4 dienas						4.				
8 dienas						5.				
15 dienas						6.				
22 dienas						7.				
29 dienas						8.				

▼M6

Par katru aktīvo sastāvdaļu sagatavo atsevišķu tabulu

Laiks	Ūdens nomaiņa	Analīzes rezultāti															
		Neapstrādātie paraugi			Apstrādātie paraugi												
		Aktīvās sastāvdaļas koncentrācija ūdenī mg/l	Emitētais daudzums mg/m^2	Emisijas ātrums $mg/m^2/d$	Aktīvās sastāvdaļas koncentrācija ūdenī				Emitētais daudzums				Emisijas ātrums			
					x	y	z	Vidēji	x	y	z	Vidēji	x	y	z	Vidēji
	Datums				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6 stundas																
24 stundas																
2 dienas																
4 dienas																
8 dienas																
15 dienas																
22 dienas																
29 dienas																

Piezīme. Tā kā neapstrādātā parauga rezultātus var izmantot, lai koriģētu apstrādāto paraugu emisijas ātrumu, neapstrādāto paraugu rezultātus norāda pirmos, un visas vērtības, kas attiecas uz apstrādātajiem paraugiem, būs "koriģētās vērtības". Koriģēt var arī sākotnējo ūdens analīzi.

▼**M6**

2. papildinājums

Definīcijas

Ķīmiskā viela ir viela vai to maisījums.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkura viela vai to maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

▼M6

C.46. BIOAKUMULĀCIJA SEDIMENTOS DZĪVOJOŠOS BENTISKOS MAZSARTĀRPOS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem *(TG)* 315 (2008. gads). Endobentiskie dzīvnieki, kas barojas ar sedimentiem, var tikt eksponēti sedimentos saistītām vielām (1). No sedimentus uzņemošo dzīvnieku vidus ūdens sistēmu pamatā liela nozīme ir ūdens mazsartārpiem. Tie mājo sedimentos un bieži vien ir visplašāk izplatītās sugas biotopos, kur vides apstākļi nav citiem dzīvniekiem labvēlīgi. Palielinot sedimentu bioloģisko duļķainību un kalpojot par medījumu, šie dzīvnieki var spēcīgi ietekmēt minēto vielu biopieejamību citiem organismiem, piemēram, bentosa zivīm. Atšķirībā no epibentiskajiem organismiem endobentiskie ūdens mazsartārpi ierokas sedimentos un barojas ar sedimentu daļiņām, kas atrodas zem to virsmas. Minētā iemesla dēļ šie organismi vielai tiek eksponēti pa daudziem uzņemšanas ceļiem, tostarp nonākot tiešā saskarē, barojoties ar piesārņotām sedimentu daļiņām, caur poru ūdeni un virsējo ūdeni. Dažas ekotoksikoloģiskajā testēšanā pašlaik izmantotas bentisko mazsartārpu sugas ir aprakstītas 6. papildinājumā.

2. Parametri, kas raksturo vielas bioakumulāciju, pirmām kārtām ir bioakumulācijas koeficients *(BAF)*, no sedimentiem notiekošās uzņemšanas ātruma konstante (k_s) un eliminācijas ātruma konstante (k_e). Detalizētas šo parametru definīcijas sniegtas 1. papildinājumā.

3. Lai vispārīgi novērtētu vielu bioakumulācijas potenciālu un izpētītu to vielu bioakumulāciju, kurām ir tendence sedimentos sadalīties vai tajos nogulsnēties, nepieciešama vides segmentam specifiska testēšanas metode (1)(2)(3)(4).

4. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai varētu novērtēt ar sedimentiem saistīto vielu bioakumulāciju endobentiskajos mazsartārpos. Sedimentus papildina ar testējamo vielu. Ar šo vielu papildināto sedimentu lietošanas mērķis ir modelēt piesārņotus sedimentus.

5. Šīs metodes pamatā ir līdzšinējās sedimentu toksicitātes un bioakumulācijas testēšanas metodes (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Var noderēt arī citi dokumenti, piemēram, starptautiskā seminārā notikušas diskusijas un tā rezultāti (11) un starptautiskas starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti (12).

6. Šo testu veic ar stabilām, neitrālām organiskām vielām, kurām ir tendence saistīties ar sedimentiem. Ar šo metodi var mērīt arī bioakumulāciju ar sedimentiem saistītos stabilos metālorganiskos savienojumos (12). Metāliem un citiem mikroelementiem (11) to izmanto, tikai mainot testēšanas plānu attiecībā uz substrāta un ūdens tilpumiem un, iespējams, – arī audu parauga lielumu.

PRIEKŠNOTEIKUMI UN INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

7. Attiecībā uz bioakumulācijas procesiem pašlaik pieejami ir tikai daži labi izstrādāti struktūras un aktivitātes kvanitatīvās sakarības modeļi *(QSAR)* (14). Visplašāk izmantotā sakarība ir stabilu organisko vielu bioakumulācijas un biokoncentrēšanās korelācija ar to lipofilitāti (izteikta kā oktanola-ūdens sadalīšanās koeficienta logaritms (log K_{ow}); definīciju sk. 1. papildinājumā), kas izstrādāta, lai aprakstītu vielas sadalīšanos starp ūdeni un zivīm. Izmantojot šo sakarības modeli, korelācijas tika noteiktas arī atsevišķi sedimentiem

▼**M6**

(15)(16)(17)(18). Korelācija log K_{ow}–log *BCF* kā svarīgs *QSAR* var noderēt pirmajai provizoriskajai aplēsei par sedimentos saistīto vielu bioakumulācijas potenciālu. Tomēr *BAF* var ietekmēt lipīdu saturs testa organismā un organiskā oglekļa saturs sedimentos. Tādējādi par svarīgu sedimentos saistītu organisko vielu bioakumulācijas rādītāju var izmantot arī organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficientu (K_{oc}).

8. Šo testu var izmantot:

— stabilām organiskām vielām, kuru log K_{ow} vērtības ir robežās no 3,0 līdz 6,0 (5)(19), un superlipofīlām vielām, kuru log K_{ow} pārsniedz 6,0 (5);

— vielām, kuras pieder pie to organisko vielu klases, kas pazīstamas ar savu potenciālu bioakumulēties dzīvajos organismos, piemēram, virsmaktīvām vielām vai ļoti adsorptīvām vielām (piemēram, ar augstu K_{oc}).

9. Pirms pētījuma uzsākšanas jāiegūst informācija par testējamo vielu, piemēram, par drošības pasākumiem, pareizas glabāšanas apstākļiem un stabilitāti, kā arī analīzes metodēm. Norādījumi par to, kā testēt vielas, kuru fizikālķīmiskās īpašības apgrūtina to testēšanu, sniegti (20) un (21). Pirms veikt bioakumulācijas testu ar ūdens mazsartārpiem, par testējamo vielu ir jābūt noskaidrotai šādai informācijai:

— vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums (vēlams, *IUPAC* nomenklatūrā), struktūrformula, *CAS* reģistra numurs un tīrība;

— šķīdība ūdenī [testēšanas metode A.6. (22)];

— oktanola-ūdens sadalīšanās koeficients K_{ow} [testēšanas metodes A.8. un A.24. (22)];

— sedimentu-ūdens sadalīšanās koeficients, kas izteikts kā K_d vai K_{oc} [testēšanas metode C.19. (22)];

— hidrolīze [testēšanas metode C.7. (22)];

— fototransformācija ūdenī (23);

— tvaika spiediens [testēšanas metode A.4. (22)];

— tūlītēja bionoārdāmība [testēšanas metodes C.4. un C.29. (22)];

— virsmas spraigums [testēšanas metode A.5. (22)];

— kritiskā micellu koncentrācija (24).

Turklāt svarīga ir arī šāda informācija, ja ir pieejama:

— bionoārdāmība ūdens vidē [testēšanas metodes C.24. un C.25. (22)];

— Henrija likuma konstante.

10. Radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas var atvieglot ūdens, sedimentu un bioloģisko paraugu analīzi, un tās var izmantot, lai noteiktu, vai noārdīšanās produkti jāidentificē un jāizsaka kvantitatīvi. Šeit aprakstītā metode ir validēta starptautiskajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā (12) attiecībā uz vielām, kas iezīmētas ar ^{14}C. Mērot kopējās radioaktīvās atliekas, bioakumulācijas koeficienta *(BAF)* pamatā ir pamatviela, kurā ietilpst arī jebkādi

▼M6

saglabājušies noārdīšanās produkti. Metabolisma pētījumu ir iespējams arī apvienot ar bioakumulācijas pētījumu, analizējot un kvantitatīvi izsakot pamatvielas un tās noārdīšanās produktu procentuālo īpatsvaru paraugos, kas ņemti uzņemšanas fāzes beigās vai bioakumulēšanās kulminācijas līmenī. Jebkurā gadījumā *BAF* aprēķina pamatā ir ieteicams likt pamatvielas koncentrāciju organismos, nevis tikai radioaktīvo atlieku kopdaudzumu.

11. Papildus testējamās vielas īpašībām ir nepieciešama arī cita informācija, proti, toksicitāte testā izmantojamām mazsartārpu sugām, piemēram, 50 % letālā koncentrācija (LC_{50}) laikā, kas nepieciešams uzņemšanas fāzē, lai nodrošinātu, ka izraudzītās ekspozīcijas koncentrācijas ir daudz zemākas par toksiskajiem līmeņiem. Priekšroka ir toksicitātes vērtībām, kas iegūtas ilgtermiņa pētījumos par subletālajiem beigupunktiem (EC_{50}), ja tie ir pieejami. Ja šādu datu nav, derīgu informāciju var sniegt akūtās toksicitātes tests apstākļos, kas identiski bioakumulācijas testēšanas apstākļiem, vai toksicitātes dati par citām surogātsugām.

12. Attiecībā uz vielas kvantitatīvo noteikšanu testēšanas šķīdumos, sedimentos un bioloģiskajā materiālā, ir nepieciešama attiecīga analīzes metode ar zināmu pareizību, precizitāti un jutību, kā arī informācija par parauga sagatavošanu un glabāšanu un materiāla drošības datu lapas. Jāzina arī testējamās vielas analītiskās noteikšanas robežas ūdenī, sedimentos un tārpu audos. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu testējamo vielu, jāzina arī specifiskā radioaktivitāte (t. i., Bq mol^{-1}), radioaktīvi iezīmētā atoma vieta un ar piemaisījumiem saistītās radioaktivitātes procents. Testējamās vielas specifiskajai radioaktivitātei jābūt iespējami augstai, lai konstatētu iespējami zemas testa koncentrācijas (11).

13. Jābūt pieejamai informācijai par izmantojamo sedimentu īpašībām (piemēram, par sedimentu vai to sastāvdaļu izcelsmi, pH un amonjaka koncentrāciju poru ūdenī (lauka apstākļos iegūtos sedimentos), organiskā oglekļa saturu *(TOC)*, daļiņu sadalījumu pēc lieluma (smilšu, dūņu un māla procents) un sausnas procents) (6).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

14. Testam ir divas fāzes – uzņemšanas (ekspozīcijas) fāze un eliminācijas (pēcekspozīcijas) fāze. Uzņemšanas fāzē tārpi ir eksponēti sedimentiem, kas papildināti ar testējamo vielu, pārlieti ar rekonstituētu ūdeni un attiecīgi līdzsvaroti (11). Kontrolgrupu tārpus tur tādos pašos apstākļos bez testējamās vielas.

15. Eliminācijas fāzē tārpus pārvieto uz sedimentu-ūdens sistēmu bez testējamās vielas. Eliminācijas fāze ir nepieciešama, lai varētu iegūt informāciju par to, cik intensīvi testa organismi izvada testējamo vielu (19)(25). Eliminācijas fāze ir nepieciešama vienmēr, izņemot gadījumus, kur testējamās vielas uzņemšana ekspozīcijas fāzē bijusi maznozīmīga (piemēram, ja nav statistiskas atšķirības starp testējamās vielas koncentrāciju testa grupas un kontrolgrupas tārpos). Ja uzņemšanas fāzē netiek sasniegts stacionārs stāvoklis, kinētisko lielumu – BAF_k, uzņemšanas un eliminācijas ātrumu konstanšu – noteikšanā var izmantot eliminācijas fāzes rezultātus. To, kā mainās testējamās vielas koncentrācija tārpos un uz tiem, novēro abās testa fāzēs.

16. Uzņemšanas fāzē mērījumus veic līdz brīdim, kad *BAF* sasniedz plato jeb stacionāru stāvokli. Pēc noklusējuma uzņemšanas fāze ilgst 28 dienas. Praktiskā pieredze liecina, ka ar 12–14 dienas ilgu uzņemšanas fāzi attiecībā uz vairākām stabilām, neitrālām organiskajām vielām pietiek, lai iestātos stacionārs stāvoklis (6)(8)(9).

▼M6

17. Tomēr, ja 28 dienās stacionārs stāvoklis neiestājas, uzsāk eliminācijas fāzi, eksponētos mazsartārpus pārvietojot uz traukiem ar tādu pašu vidi, bet bez testējamās vielas. Eliminācijas fāzi izbeidz vai nu tad, kad koncentrācijas līmenis sasniedzis 10 % no koncentrācijas, kas tārpos konstatēta uzņemšanas fāzes 28. dienā, vai pēc maksimālā perioda 10 dienas. Atlieku līmeni tārpos eliminācijas fāzes beigās pārskatā ieraksta kā papildu beigupunktu, piemēram, kā neeliminētās atliekas *(NER)*. Bioakumulācijas koeficientu (BAF_{ss}) vislabāk rēķināt gan kā attiecību starp koncentrāciju tārpos (C_a) un sedimentā (C_s) acīmredzami stacionārā stāvoklī, gan kā kinētisko bioakumulācijas koeficientu BAF_K, kas ir attiecība starp no sedimentiem notiekošās uzņemšanas ātruma konstanti (k_s) un eliminācijas ātruma konstanti (k_e), pieņemot pirmās kārtas kinētiku. Ja 28 dienās netiek sasniegts stacionārs stāvoklis, BAF_K aprēķina no uzņemšanas ātruma un eliminācijas ātruma konstantēm. Aprēķinus sk. 2. papildinājumā. Ja neizmanto pirmās kārtas kinētiku, jālieto sarežģītāki modeļi (2. papildinājums un literatūras avots (25)).

18. Ja 28 dienās stacionāru stāvokli nesasniedz, uzņemšanas fāzi pēc izvēles var arī paildzināt, eksponēto tārpu grupām, ja tādas ir pieejamas, veicot papildu mērījumus līdz pat stacionāra stāvokļa sasniegšanai; tomēr līdztekus uzņemšanas fāzes 28. dienā ir jāuzsāk eliminācijas fāze.

19. Uzņemšanas ātruma konstanti, eliminācijas ātruma konstanti (vai konstantes, ja tiek izmantoti sarežģītāki modeļi), kinētisko bioakumulācijas koeficientu (BAF_K) un, ja iespējams, arī katra šā parametra ticamības robežas aprēķina, izmantojot datorizētus paraugvienādojumus (paraugus sk .2. papildinājumā). Jebkura parauga piemērotību var noteikt, pamatojoties uz korelācijas koeficientu jeb noteikšanas koeficientu (ja šis koeficients ir tuvs 1, piemērotība ir pietiekama).

20. Lai mazinātu testa rezultātu mainību organiskām vielām ar augstu lipofilitāti, bioakumulācijas koeficienti papildus jāizsaka arī attiecībā pret lipīdu saturu testa organismos un organiskā oglekļa saturu *(TOC)* sedimentos (biotas-sedimentu akumulācijas koeficients jeb *BSAF* uz kilogramu sedimentu *TOC* un kg^{-1} lipīdu satura tārpos). Šādas pieejas pamatā ir pieredze un teorētiskās korelācijas attiecībā uz vides ūdens segmentu, kur – attiecībā uz dažām ķīmisko vielu klasēm – starp vielas bioakumulācijas potenciālu un tās lipofilitāti pastāv skaidra sakarība, kas ir pietiekami konstatēta zivīm kā modeļa organismiem (14)(25)(27). Sakarība pastāv arī starp lipīdu saturu testa zivīs un šādu vielu novēroto bioakumulāciju. Līdzīgas korelācijas ir konstatētas attiecībā uz bentiskajiem organismiem (15)(16)(17)(18). Ja tārpu audi ir pieejami pietiekamā daudzumā, lipīdu saturu testa dzīvnieku organismā var noteikt ar to pašu bioloģisko materiālu, kas lietots testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai. Tomēr, lai izmērītu lipīdu saturu, ko pēc tam var izmantot *BAF* vērtību standartizēšanai, praksē ir izdevīgāk lietot aklimatizētus kontrolgrupas dzīvniekus vismaz uzņemšanas fāzes sākumā vai – vislabāk – beigās.

TESTA DERĪGUMS

21. Lai tests būtu derīgs, jāievēro šādi nosacījumi.

— Tārpu kumulatīvā mirstība (kontrolgrupā un apstrādes grupās) līdz testēšanas beigām nedrīkst pārsniegt 20 % sākotnējā skaita.

— Turklāt, lai ekspozīcija tiktu atzīta par maksimālu, ir jāpierāda, ka tārpi ierokas sedimentos. Papildu informāciju sk. 28. punktā.

▼M6

METODES APRAKSTS

Testa sugas

22. Testam var izmantot vairākas ūdens mazsartārpu sugas. Visbiežāk izmantotās sugas ir minētas 6. papildinājumā.

23. Lai pierādītu testa dzīvnieku veselības stāvokli, regulāri (piemēram, reizi mēnesī) ar standarta toksikantu, piemēram, kālija hlorīdu (KCl) vai vara sulfātu ($CuSO_4$) (1), jāveic toksicitātes testi (96 stundas, tikai ūdenī) (1)(6). Ja regulāri neveic toksicitātes standarttestus, organismu daļa, kas izmantojama sedimentu bioakumulācijas testā, jāpārbauda ar standarta toksikantu. Noderīgu informāciju par dzīvnieku stāvokli var gūt arī no lipīdu satura mērījumiem.

Testa organismu kultivēšana

24. Lai bioakumulācijas testu veikšanai pietiktu tārpu, iespējams, tie jātur pastāvīgā vienas sugas laboratoriskā kultūrā. Izraudzīto testa sugu laboratoriskās kultivēšanas metodes ir apkopotas 6. papildinājumā. Papildu informācija ir atrodama literatūras avotos (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Aprīkojums

25. Jācenšas nevienā aprīkojuma daļā nelietot materiālus, kas var izšķīst, absorbēt testējamās vielas vai izskalot citas vielas un nelabvēlīgi ietekmēt testa dzīvniekus. Var izmantot no ķīmiski inerta materiāla izgatavotas taisnstūrainas vai cilindriskas standartkameras, kurām ir pietiekama, noslogojumam, t. i., testējamo tārpu skaitam, atbilstoša ietilpība. Ūdens vai gaisa ievadīšanai jāizvairās lietot mīkstas plastmasas caurules. Jebkuram aprīkojumam, kas ir saskarē ar testēšanas vidēm, jābūt no politetrafluoretilēna, nerūsošā tērauda un/vai stikla. Vielām ar augstu adsorbcijas koeficientu, piemēram, sintētiskajiem piretroīdiem, var būt nepieciešams silanizēts stikls. Šādās situācijās aprīkojums pēc izmantošanas būs jālikvidē (5). Attiecībā uz radioaktīvi iezīmētām testējamām vielām un gaistošām vielām jācenšas izvairīties no testējamās vielas atsegšanas un atsegtās testējamās vielas noplūdes. Jāizmanto lamatas (piemēram, gāzes mazgāšanai paredzētas stikla pudeles), kas satur piemērotus absorbentus, kuros saglabājas jebkuras atliekas, kas iztvaiko no testēšanas kamerām (11).

Ūdens

26. Virsējā ūdens kvalitātei jābūt tādai, lai testa sugas dzīvnieki aklimatizācijas laiku un testēšanas periodus izturētu bez izskata vai izturēšanās anomāliju parādīšanās. Par virsējo ūdeni testos, kā arī laboratoriskajās tārpu kultūrās ir ieteicams lietot rekonstituēto ūdeni saskaņā ar testēšanas metodi C.1. (25). Ir pierādīts, ka vairākas testa sugas šajā ūdenī spēj izdzīvot, augt un vairoties (8), un ir nodrošināta maksimāla testa un kultivēšanas apstākļu standartizācija. Ūdens ir jāraksturo vismaz pēc pH, elektrovadītspējas un cietības. Lietderīgu informāciju pirms lietošanas var sniegt ūdens analīze attiecībā uz mikropiesārņotājiem (4. papildinājums).

27. Ūdens kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Virsējā ūdens pH jābūt robežās no 6 līdz 9. Kopējai cietībai testa sākumā ir jābūt no 90 līdz 400 mg $CaCO_3$ uz vienu litru (7). Minētā rekonstituētā ūdens pH un cietības diapazoni ir

▼M6

norādīti testēšanas metodē C.1. (25). Ja rodas aizdomas par cietības jonu un testējamās vielas mijiedarbību, izmanto ūdeni ar mazāku cietību. Saskaņā ar ESAO *TG* 210 (34) pieņemama atšķaidīšanas ūdens papildkritēriji ir apkopoti 4. papildinājumā.

Sedimenti

28. Sedimentu kvalitātei jābūt tādai, lai testa organismi aklimatizācijas laiku un testēšanas periodus spētu izdzīvot un, vēlams, arī vairoties bez izskata vai izturēšanās anomāliju parādīšanās. Tārpiem ir jāierokas sedimentos. Ar ierakšanos saistītā izturēšanās var ietekmēt ekspozīciju un pēc tam arī *BAF*. Tādēļ ir jāatzīmē testa organismu vairīšanās no sedimentiem vai ar ierakšanos saistītā izturēšanās, ja vien virsējā ūdens duļķainuma pakāpe pieļauj šādu novērošanu. Tārpiem (gan no kontrolgrupas, gan no apstrādes grupas) jāierokas sedimentos 24 stundu laikā pēc ievietošanas testēšanas traukos. Ja konstatē, ka ierakšanās vispār nenotiek vai ka tārpi no sedimentiem izvairās (piemēram, vairāk nekā 20 % ilgāk nekā pusi no uzņemšanas fāzes), tas liecina, ka testēšanas apstākļi nav piemēroti vai testa organismi nav veseli, vai arī šādu izturēšanos izraisa testējamās vielas koncentrācija. Šādā gadījumā tests jāaptur un jāatkārto uzlabotos apstākļos. Papildu informācija par barošanos ar sedimentiem ir iegūstama, izmantojot literatūras avotos (35)(36) aprakstītās metodes, pēc kurām var precizēt barošanos ar sedimentiem vai daļiņu atlasi testa organismos. Novērojamības robežās jāatzīmē vismaz tas, vai uz sedimentu virsmas ir vai nav fekāliju granulas, kas apliecina, ka tārpi barojas ar sedimentiem, un tas ir jāņem vērā, interpretējot testa rezultātus attiecībā uz ekspozīcijas mehānismu.

29. Gan testos, gan laboratorijas tārpu kultūrās (5. papildinājums) ieteicams lietot mākslīgos sedimentus, kuru pamatā testēšanas metodē C.8. (40) aprakstītā mākslīgā augsne, jo iespējams, ka attiecīgas kvalitātes dabiskie sedimenti nav visu gadu pieejami. Turklāt testu var ietekmēt vietējie organismi, kā arī iespējamā mikropiesārņotāju klātbūtne dabiskajos sedimentos. Mākslīgajos sedimentos spēj izdzīvot, augt un vairoties vairākas testa sugas (8).

30. Mākslīgie sedimenti ir jāraksturo vismaz pēc sastāvdaļu izcelsmes, daļiņu sadalījuma pēc lieluma (smilšu, dūņu un māla procents), organiskā oglekļa satura *(TOC)*, ūdens satura un pH. Pēc izvēles var mērīt arī redokspotenciālu. Tomēr par testa un/vai kultūras sedimentiem var izmantot arī dabiskos sedimentus no nepiesārņotām vietām (1). Dabiskie sedimenti ir jāraksturo vismaz pēc izcelsmes (ievākšanas vietas), pH un amonjaka satura poru ūdenī, pēc organiskā oglekļa satura *(TOC)*, daļiņu sadalījuma pēc lieluma (smilšu, dūņu un māla procents) un ūdens satura procentos (6). Ja paredzams, ka veidosies amonjaks, pirms dabisko sedimentu papildināšanas ar testējamo vielu ieteicams tos septiņas dienas nogatavināt tādos pašos apstākļos, kādi būs turpmākajā testā. Šā nogatavināšanas perioda beigās virsējais ūdens jānolej un jāizlej. Lietderīgu informāciju pirms lietošanas var sniegt sedimentu vai to sastāvdaļu analīze attiecībā uz mikropiesārņotājiem.

Sagatavošana

31. Darbības ar dabiskajiem sedimentiem pirms to lietošanas laboratorijā ir aprakstītas literatūras avotos (1)(6)(44). Mākslīgo sedimentu gatavošana ir aprakstīta 5. papildinājumā.

▼M6

Glabāšana

32. Dabisko sedimentu glabāšanai laboratorijā ir jābūt iespējami īsai. ASV Vides aizsardzības aģentūra (6) par maksimālo glabāšanas termiņu iesaka noteikt 8 nedēļas 4 ± 2°C temperatūrā tumsā. Glabāšanas tvertnēs virs sedimentiem nedrīkst atstāt tukšu telpu. Mākslīgu sedimentu glabāšana ieteikumi ir sniegti 5. papildinājumā.

Testējamās vielas lietošana

33. Sedimentus papildina ar testējamo vielu. Papildināšanas procedūrā ar testējamo vielu pārklāj vienu vai vairākas sedimentu sastāvdaļas. Piemēram, piemērotā šķīdinātājā kopā ar testējamās vielas šķīdumu var iemērkt kvarca smiltis vai to porciju (piemēram, 10 g kvarca smilšu uz vienu testēšanas trauku), šķīdinātāju pēc tam lēni iztvaicējot līdz izžūšanai. Pārklāto frakciju pēc tam var iemaisīt mitrajos sedimentos. Smilšu daudzums testējamās vielas un smilšu maisījumā jāņem vērā sedimentu gatavošanā, t. i., sedimenti tādēļ jāgatavo, izmantojot mazāk smilšu (6).

34. Dabiskajiem sedimentiem testējamo vielu var pievienot, ar to papildinot izžāvētu sedimentu porciju, kā iepriekš aprakstīts attiecībā uz mākslīgiem sedimentiem, vai testējamo vielu iemaisot mitros sedimentos un pēc tam jebkuram izmantotajam šķīdinātājam ļaujot izgarot. Mitru sedimentu papildināšanai piemēroti šķīdinātāji ir etanols, metanols, etilēnglikola monometilēteris, etilēnglikola dimetilēteris, dimetilformamīds un trietolēnglikols (5)(34). Piemērota šķīdinātāja atlases galvenajam kritērijam jābūt šķīdinātāja toksicitātei un gaistamībai, kā arī testējamās vielas šķīdībai izraudzītajā šķīdinātājā. Papildu norādījumi par papildināšanas procedūrām ir sniegti izdevumā *Environment Canada* (1995) (41). Jācenšas nodrošināt, lai sedimentiem pievienotā testējamā viela sedimentos būtu viscaur un vienmērīgi izkliedēta. Analizē papildināto sedimentu apakšparaugu replikātus, lai pārbaudītu testējamās vielas koncentrāciju sedimentos un noteiktu testējamās vielas viendabīguma pakāpi.

35. Kad papildinātie sedimenti ar virsējo ūdeni ir sagatavoti, vēlams nodrošināt testējamās vielas sadalīšanos starp sedimentiem un ūdens fāzi. To vēlams īstenot tādos pašos temperatūras un aerācijas apstākļos, kādus izmanto testēšanā. Attiecīgais līdzsvarošanās laiks ir atkarīgs no sedimentiem un vielas un var ilgt no dažām stundām līdz vairākām dienām, retos gadījumos – vairākas nedēļas (4–5) (28)(42). Šajā testā negaida līdzsvara iestāšanos, bet 48 stundu līdz 7 dienu līdzsvarošanās periods ir ieteicams. Atkarībā no pētījuma mērķa, piemēram, vides apstākļu imitācijas, papildinātos sedimentus līdzsvarot vai nostādināt var ilgāku laiku (11).

TESTĒŠANAS NORISE

Priekštestēšana

36. Lai testēšanas apstākļus optimizētu galīgajam testam, piemēram, izraudzītos testējamās vielas koncentrāciju (koncentrācijas) un noteiktu uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes ilgumu, var noderēt priekšeksperiments. Priekštestēšanā jānovēro un jāatzīmē tārpu izturēšanās, piemēram, vairīšanās no

▼M6

sedimentiem, jeb to bēgšana no sedimentiem, kuru var būtu izraisījusi testējamā viela un/vai paši sedimenti. Vairīšanos no sedimentiem priekštestēšanā var izmantot arī kā subletālu parametru, ar kura palīdzību aplēš bioakumulācijas testā lietojamo testējamās vielas koncentrāciju.

Ekspozīcijas nosacījumi

Uzņemšanas fāzes ilgums

37. Testa organismus uzņemšanas fāzē eksponē testējamai vielai. Pirmais paraugs ir jāņem no 4 līdz 24 stundu laikā pēc uzņemšanas fāzes sākuma. Uzņemšanas fāze būtu jāturpina 28 dienas (1)(6)(11), ja vien nevar pierādīt, ka līdzsvars ir sasniegts agrāk. Stacionārs stāvoklis iestājas, kad: i) bioakumulācijas koeficientu attēls katrā paraugu ņemšanas periodā attiecībā pret laiku ir laika asij paralēls; ii) trīs *BAF* analīzes pēc kārtas, kas ņemtajiem paraugiem veiktas ar vismaz divu dienu starplaiku, viena no otras atšķiras ne vairāk kā par ± 20 %; un iii) starp šiem trim paraugu ņemšanas periodiem nav būtisku atšķirību (pamatojoties uz statistiskiem salīdzinājumiem, piemēram, dispersijas analīzi un regresijas analīzi). Ja 28 dienu laikā stacionārs stāvoklis netiek sasniegts, uzņemšanas fāzi var beigt, uzsākot eliminācijas fāzi, un BAF_K var aprēķināt pēc uzņemšanas un eliminācijas ātruma konstantēm (skatīt arī 16.–18. punktu).

Eliminācijas fāzes ilgums

38. Pirmais paraugs jāņem no 4 līdz 24 stundu laikā pēc eliminācijas fāzes uzsākšanas, jo sākotnējā periodā var notikt straujas izmaiņas audu atliekās. Eliminācijas fāzi ieteicams beigt vai nu tad, kad testējamās vielas koncentrācija ir mazāka par 10 % stacionārā stāvokļa koncentrācijas, vai arī pēc maksimālā 10 dienu ilguma. Atlieku līmeni tārpos eliminācijas fāzes beigās atspoguļo kā sekundāru beigupunktu. Šo periodu tomēr nosaka periods, kurā testējamās vielas koncentrācija tārpos paliek virs analītiskās noteikšanas robežas.

Testa organismi

Testa tārpu skaits

39. Tārpu skaitam katrā paraugā ir jānodrošina tāda tārpu audu masa, lai testējamās vielas masa katrā paraugā attiecīgi uzņemšanas fāzes sākumā un eliminācijas fāzes beigās būtu ievērojami lielāka par testējamās vielas noteikšanas robežu bioloģiskā materiālā. Minētajās uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes pakāpēs koncentrācija testa dzīvniekos parasti ir samērā zema (6)(8)(18). Tā kā individuālais svars daudzām ūdens mazsartārpu sugām ir ļoti mazs (*Lumbriculus variegatus* un *Tubifex tubifex* individuālais mitrais svars 5–10 mg), svēršanai un testējamās ķīmiskās vielas analīzei konkrētā replikāta testēšanas kamerā var izmantot tārpu kopējo masu. Testa sugām ar lielāku individuālo svaru (piemēram, *Branchiura sowerbyi*) var izmantot replikātus ar vienu īpatni, taču šādā gadījumā replikātu skaits katrā paraugu ņemšanas punktā jāpalielina līdz pieci (11). Tomēr jāpiebilst, ka starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā *B. sowerbyi* nebija iekļauti (12), tādēļ šī suga nav ieteicama kā minētajai metodei piemērotākā.

40. Jāizmanto līdzīga lieluma tārpi (par *L. variegatus* skatīt 6. papildinājumu). Tie iegūstami no viena avota, un tiem jābūt vienas vecuma kategorijas pieaugušiem vai lieliem dzīvniekiem (sk. 6. papildinājumu). Dzīvnieka svars un vecums var būtiski ietekmēt *BAF* vērtības (jo piemēram, atšķiras lipīdu satura un/vai organismos ir olas); šie parametri ir rūpīgi jāreģistrē. Lai izmērītu vidējo mitro svaru un saussvaru, pirms testa uzsākšanas nosver tārpu apakšparaugu.

▼M6

41. Izmantojot *Tubifex tubifex* un *Lumbriculus variegatus*, testēšanas periodā sagaida vairošanos. Ja bioakumulācijas testā nenotiek vairošanās, tas jāatspoguļo un jāņem vērā, interpretējot testa rezultātus.

Noslogojums

42. Lai uzņemšanas fāzē testa vielas koncentrācija sedimentos samazinātos lēnāk un lai nesamazinātos izšķīdušā skābekļa koncentrācija, jāizmanto augsta sedimentu-tārpu un ūdens-tārpu attiecība. Izraudzītajam noslogojumam jāatbilst arī izraudzīto sugu dabiski sastopamajam populācijas blīvumam (43). Piemēram, attiecībā uz *Tubifex tubifex* ir ieteicams noslogojums 1–4 mg tārpu audu (mitrais svars) uz vienu gramu mitru sedimentu (8)(11). Attiecībā uz *L. Variegatus* iesaka noslogojumu, kas ir ≤ 1 g tārpu audu saussvara uz 50 g sedimentu organiskā oglekļa (1)(6).

43. Testā izmantojamos tārpus izņem no kultūras, izsijājot tās sedimentus. Dzīvniekus (pieaugušus vai lielus tārpus bez nesenas fragmentācijas pazīmēm) pārvieto uz stikla šķīvjiem (piemēram, Petri platēm) ar tīru ūdeni. Ja testēšanas apstākļi atšķiras no kultivēšanas apstākļiem, pietiek ar 24 stundu aklimatizāciju. Pirms nosvēršanas tārpus atbrīvo no liekā ūdens. To var izdarīt, tārpus saudzīgi novietojot uz iepriekš samitrinātas salvetes. Tārpu nosusināšanai nav ieteicams izmantot absorbējošu papīru, jo tas tārpiem var izraisīt stresu vai tos savainot. *Brunson et al.* (1998) iesaka izmantot nenosusinātus tārpus, kuru biomasa aptuveni 1,33 reizes pārsniedz vēlamo biomasu. Šie papildu 33 % atbilst starpībai starp nosusinātiem un nenosusinātiem tārpiem (28).

44. Uzņemšanas fāzes sākumā (testa 0. dienā) testa organismus izņem no aklimatizācijas kameras un pēc nejaušības principa sadala pa traukiem (piemēram, pa Petri platēm), kas satur rekonstituētu ūdeni, un katrā traukā pievieno tārpus grupās pa divi, līdz katrā traukā ir desmit tārpi. Pēc tam katru no šīm tārpu grupām ar mīkstu tērauda pinceti vai kā citādi pēc nejaušības principa ievieto atsevišķos testēšanas traukos. Tad testēšanas traukus atbilstoši testēšanas nosacījumiem inkubē.

Barošana

45. Ņemot vērā zemo barības vielu saturu mākslīgajos sedimentos, tajos ir jānodrošina barības vielu avots. Lai pārāk zemu nenovērtētu testējamo organismu eksponētību, kas notiek, piemēram, selektīvi izbarojot nepiesārņotu barību, barību, kas nepieciešama, lai testa organismi vairotos un augtu, sedimentiem pievieno vienreiz – pirms testējamās vielas pievienošanas vai tās laikā (sk. 5. papildinājumu).

Sedimentu un ūdens attiecība

46. Ieteicamā sedimentu un ūdens attiecība ir 1:4 (45). Uzskatāms, ka šī attiecība ir piemērota, lai būtu nodrošināts pietiekams skābekļa koncentrācijas līmenis un novērsta amonjaka uzkrāšanos virsējā ūdenī. Skābekļa saturs virsējā ūdenī jāuztur ar ≥ 40 % piesātinājumu. Virsējo ūdeni testēšanas traukos viegli aerē (piemēram, 2–4 burbuļi sekundē), izmantojot Pastēra pipeti, kas novietota aptuveni 2 cm virs sedimentu virsmas, lai mazinātu sedimentu uzduļķošanu.

▼M6

Gaisma un temperatūra

47. Fotoperiods kultūrā un testā ir 16 stundas (1)(6). Gaismas intensitāte testa zonā jānodrošina aptuveni 500–1 000 luksu līmenī. Temperatūrai visā testēšanas laikā jābūt 20 ± 2 °C.

Testēšanas koncentrācijas

48. Uzņemšanas kinētikas noteikšanai izmanto vienu testēšanas koncentrāciju (iespējami zemu), bet var izmantot arī otru (augstāku) (piemēram, (46)). Tādā gadījumā paraugus ņem un analizē stacionārā stāvoklī vai pēc 28 dienām, lai apstiprinātu *BAF*, kas izmērīts ar zemāko koncentrāciju (11). Augstāko koncentrāciju izraugās tādu, lai nebūtu iespējama nelabvēlīga ietekme (piemēram, izraugoties aptuveni 1 % no zemākās zināmās hroniskās ietekmes koncentrācijas EC_x, kas izsecināta no attiecīgiem hroniskās toksicitātes pētījumiem). Zemākajai testēšanas koncentrācijai jābūt krietni augstākai par izmantotās analīzes metodes noteikšanas robežu sedimentos un bioloģiskajos paraugos. Ja ietekmi izraisošā testējamās vielas koncentrācija ir tuva analītiskās noteikšanas robežai, ieteicams izmantot radioaktīvi iezīmētu testa vielu ar augstu īpatnējo radioaktivitāti.

Apstrādes grupas un kontrolgrupas replikāti

49. Kinētikas mērījumu vajadzībām visā uzņemšanas fāzē un visā eliminācijas fāzē katrā paraugu ņemšanas punktā no apstrādes grupas jābūt ņemtiem vismaz trim replikātiem (11). Papildu replikātus izmanto tad, ja vēl kādos datumos ņem neobligātus paraugus. Eliminācijas fāzei attiecīgā skaitā sagatavo replikātus ar nepapildinātiem sedimentiem un virsējo ūdeni, lai apstrādātos tārpus uzņemšanas fāzes beigās no īpašajiem apstrādes traukiem varētu pārvietot uz neapstrādātiem traukiem. Ar kopējo no apstrādes grupas ņemto replikātu skaitu jāpietiek gan uzņemšanas fāzei, gan eliminācijas fāzei.

50. Cita iespēja ir tāda, ka eliminācijas fāzes paraugu ņemšanai paredzētos tārpus var eksponēt vienā lielā tvertnē, kas satur ar ķīmisko vielu papildinātus sedimentus no tās pašas partijas, ko izmanto uzņemšanas kinētikas noteikšanai. Ir jāpierāda, ka testēšanas apstākļi (piemēram, sedimentu dziļums, sedimentu un ūdens attiecība, noslogojums, temperatūra, ūdens kvalitāte) ir salīdzināmi ar apstākļiem uzņemšanas fāzei paredzētajos replikātos. Uzņemšanas fāzes beigās no šīs tvertnes analīzēm jāņem ūdens, sedimentu un tārpu paraugi, un no tās uzmanīgi jāizņem un eliminācijas fāzei paredzētajos replikātos pietiekamā skaitā jāievieto lieli tārpi bez nesenas fragmentācijas pazīmēm (piemēram, katrā replikāta traukā desmit organismi).

51. Ja vienīgais izmantotais šķīdinātājs ir ūdens, bioloģiskajām un fona analīzēm nodrošina vismaz deviņus negatīvās kontroles replikātus (vismaz trīs paraugus, kas ņemti sākumā, trīs – uzņemšanas fāzes beigās un vēl trīs – eliminācijas fāzes beigās). Ja testējamās vielas lietošanā izmanto kādu šķīdinātāju, jāveic šķīdinātāja kontrole (vismaz trīs replicēti paraugi jāņem sākumā, trīs – uzņemšanas fāzes beigās un vēl trīs – eliminācijas fāzes beigās). Šādā gadījumā paraugu ņemšanas vajadzībām uzņemšanas fāzes beigās jānodrošina vismaz četri negatīvās kontroles replikāti (bez šķīdinātāja). Lai iegūtu informāciju par šķīdinātāja iespējamo ietekmi uz testa organismiem, šos replikātus var bioloģiski salīdzināt ar šķīdinātāja kontroles trauku. Papildu informācija ir sniegta 3. papildinājumā.

▼M6

Ūdens kvalitātes mērīšanas biežums

52. Uzņemšanas fāzē un eliminācijas fāzē virsējam ūdenim ir jāmēra vismaz šādi ūdens kvalitātes parametri.

Temperatūra	katrā paraugu ņemšanas datumā vienā traukā katram apstrādes līmenim un vienreiz nedēļā, kā arī uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes sākumā un beigās vienā kontroles traukā; var arī piemēram, nepārtraukti vai ar stundu ilgiem starplaikiem reģistrēt temperatūru apkārtējā vidē (apkārtējā gaisā vai ūdens peldē) vai vienā reprezentatīvā testēšanas traukā;
Izšķīdušā skābekļa saturs	katrā paraugu ņemšanas datumā vienā traukā katram apstrādes līmenim un vienā kontroles traukā; izsaka mg/L un % *ASV* (gaisa piesātinājuma vērtība);
Gaisa padeve	kontrolē vismaz vienreiz dienā (darba dienās) un noregulē pēc vajadzības;
pH	katrā paraugu ņemšanas datumā vienā apstrādes traukā katram apstrādes līmenim un vienreiz nedēļā, kā arī uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes sākumā un beigās vienā kontroles traukā;
Kopējā ūdens cietība	vismaz vienā apstrādes traukā un vienā kontroles testa traukā uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes sākumā un beigās, izsaka mg/l $CaCO_3$;
Kopējais amonjaka saturs	vismaz vienā apstrādes traukā un vienā kontroles testa traukā uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes sākumā un beigās, izsaka mg/l NH_4^+ vai NH_3, vai kā kopējo amonjaka slāpekli.

Tārpu, sedimentu un ūdens paraugu ņemšana un analīze

Paraugu ņemšanas grafiks

53. Paraugu ņemšanas grafiku piemēri 28 dienu uzņemšanas fāzei un 10 dienu eliminācijas fāzei ir sniegti 3. papildinājumā.

54. Ūdens un sedimentu paraugus no testēšanas kamerām ņem, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju pirms tārpu ielaišanas, kā arī uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes laikā. Testa laikā nosaka testējamās vielas koncentrācijas tārpos, sedimentos un ūdenī, lai novērotu testējamās vielas izkliedēšanos dažādos testēšanas sistēmas segmentos.

55. Tārpu, sedimentu un ūdens paraugus uzņemšanas fāzē, kā arī eliminācijas fāzē ņem vismaz sešas reizes.

56. Paraugu ņemšanu turpina, līdz iestājies plato (stacionārs stāvoklis) (skatīt 1. papildinājumu), vai 28 dienas. Ja 28 dienu laikā plato neiestājas, sāk eliminācijas fāzi. Uzsākot eliminācijas fāzi, izraudzītos tārpus pārvieto uz replikātu kamerām, kurās ir neapstrādāti sedimenti un ūdens (skatīt arī 17. un 18. punktu).

Paraugu ņemšana un paraugu sagatavošana

57. Iegūst ūdens paraugus, izlejot, iztecinot vai ar pipeti ņemot tilpumu, ar ko pietiek testējamās vielas daudzuma izmērīšanai paraugā.

58. Testēšanas kamerās atlikušo virsējo ūdeni uzmanīgi izlej vai iztecina. Sedimentu paraugi jāņem uzmanīgi, lai tārpus iespējami maz traucētu.

▼M6

59. Paraugu ņemšanas laikā no testa replikāta izņem visus tārpus, piemēram, sedimentus suspendējot virsējā ūdenī un katra replikāta saturu izkliedējot uz seklas paplātes, bet tārpus ņemot ar mīksta tērauda pinceti. Tos seklā stikla vai tērauda paplātē ātri noskalo ar ūdeni. Lieko ūdeni notecina. Tārpus uzmanīgi pārvieto iepriekš nosvērtā traukā un tos nosver. Tārpus nonāvē sasaldējot (piemēram, ≤ – 18 °C temperatūrā). Reģistrē kokonu un/vai jauno īpatņu esamību un skaitu.

60. Uzreiz pēc paraugu ņemšanas tārpi ir bez zarnu attīrīšanās posma jānosver un jānonāvē, lai iegūtu piesardzīgi aplēstu *BAF*, kurā ierēķināts piesārņoto zarnu saturs, un lai kādā periodā, kad notiek zarnu attīrīšanās tikai ūdenī (8), nezustu ķermenī esošas atliekas. Paredzams, ka jebkurā periodā, kurā notiek zarnu attīrīšanās tikai ūdenī, netiks būtiski eliminētas vielas, kam log K_{ow} pārsniedz pieci, bet vielas, kam log K_{ow} zemāks par četri, var zust diezgan būtiski (47).

61. Eliminācijas fāzē tārpiem attīrās zarnas tīros sedimentos. Tas nozīmē, ka mērījumi, kas veikti tieši pirms eliminācijas fāzes, aptver piesārņotos zarnu sedimentus, bet pieņem, ka pēc pirmajām 4–24 eliminācijas fāzes stundām lielāko daļu piesārņotā zarnu satura ir nomainījuši tīri sedimenti (11)(47). Tad var uzskatīt, ka šajā tārpu paraugā vielas koncentrācija ir tāda pati kā koncentrācija audos pēc zarnu attīrīšanās. Lai eliminācijas fāzē ņemtu vērā testējamās vielas koncentrācijas atšķaidīšanos ar nepiesārņotiem sedimentiem, var aplēst zarnu satura svaru pēc tārpu mitrā svara/tārpu pelnu svara vai tārpu saussvara/tārpu pelnu svara attiecības.

62. Ja konkrētā pētījuma mērķis ir izmērīt biopieejamību un patiesās audos esošās atliekas testa organismos, tad vismaz apstrādāto dzīvnieku apakšparaugs (piemēram, no trim papildu replikātu traukiem) jānosver, ieteicams, paraugus ņemot tad, kad iestājies stacionārs stāvoklis, tīrā ūdenī sešas stundas (47) attīrot un vēlreiz nosverot pirms analīzes. Pēc tam datus par tārpu svaru un koncentrāciju ķermenī šajā apakšparaugā var salīdzināt ar vērtībām, kas iegūtas no neattīrītiem tārpiem. Lai dzīvniekiem iespējami neradītu papildu stresu, eliminācijas mērījumiem paredzētie tārpi nebūtu jāattīra, pirms tie nav pārvietoti tīros sedimentos.

63. Lai novērstu noārdīšanos vai citus zudumus un lai turpmākajā testa gaitā varētu aprēķināt aptuveno uzņemšanas ātrumu un eliminācijas ātrumu, ūdens, sedimentu un tārpu paraugus vislabāk analizēt uzreiz pēc izņemšanas (t. i., 1–2 dienu laikā). Tūlītēja analīze arī palīdz bez kavēšanās noteikt līknes plato sasniegšanu.

64. Ja analīzi neveic uzreiz, paraugi jāglabā piemērotos apstākļos. Informāciju par konkrētās testējamās vielas stabilitāti un pareizajiem glabāšanas apstākļiem (piemēram, par glabāšanas ilgumu un temperatūru, ekstrakcijas procedūrām utt.) iegūst pirms pētījuma uzsākšanas. Ja šāda informācija nav pieejama un to uzskata par nepieciešamu, glabāšanas stabilitātes noteikšanai paralēli var izmantot ar testa vielu papildinātus kontroles audus.

Analīzes metodes kvalitāte

65. Tā kā visu procedūru būtībā nosaka testējamajai vielai izmantotās analīzes metodes pareizība, precizitāte un jutība, eksperimentāli pārbauda, vai ar konkrēto metodi apmierinoša ir ķīmiskās analīzes precizitāte un reproducējamība, kā arī testējamās vielas atgūstamība ūdens, sedimentu un tārpu paraugos. Pārbauda arī, vai kontrolkamerās testējamā viela nav konstatējama

▼M6

koncentrācijās, kas pārsniedz fonu. Ja nepieciešams, koriģē C_w, C_s un C_a vērtības attiecībā uz atgūstamību un attiecībā uz fona vērtībām, kas iegūtas ar kontrolgrupu. Testa laikā ar visiem paraugiem rīkojas tā, lai līdz minimumam samazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, tos, kas rodas, testējamajai vielai adsorbējoties uz paraugu ņemšanas ierīces).

66. Testējamās vielas kopējo atgūstamību un atgūstamību tārpos, sedimentos, ūdenī un, ja tādas izmanto, arī lamatās, kas satur absorbentus, kuri aiztur iztvaikojošo testējamo vielu, reģistrē un atspoguļo pārskatā.

67. Tā kā ieteicams izmantot radioaktīvi iezīmētas vielas, ir iespējams analizēt kopējo radioaktivitāti (t. i., pamatvielai un noārdīšanās produktiem). Tomēr, ja analītiski ir iespējama pamatvielas un noārdīšanās produktu kvantitatīva izteikšana stacionārā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās, tā var sniegt nozīmīgu informāciju. Ja tiek plānots veikt šādus mērījumus, ar paraugiem veic attiecīgas ekstrakcijas procedūras, lai pamatvielu varētu kvantitatīvi izteikt atsevišķi. Ja kādam no konstatētajiem noārdīšanās produktiem ir būtisks īpatsvars (piemēram, > 10 %) radioaktivitātē, kas testa organismiem izmērīta stacionārā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās, šos noārdīšanās produktus ir vēlams norādīt (5).

68. Tā kā individuālā biomasa ir maza, testējamās vielas koncentrāciju katrā atsevišķajā tārpā bieži vien nav iespējams noteikt, ja vien par testa sugu neizmanto *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg mitrā svara vienam tārpam) (11). Tādēļ no viena testēšanas trauka ņemtus īpatņus drīkst apstrādāt kopā, taču tas ierobežo statistiskās procedūras, ko var piemērot datiem. Ja ir būtiski izmantot konkrētu statistisku procedūru un svarīga ir statistiskā jauda, testā iekļauj tik daudz testa dzīvnieku un/vai replikāta testēšanas kameru, lai vēlamajai apkopošanai, procedūrai un statistiskajai jaudai ar to pietiktu.

69. Ieteicams *BAF* izteikt gan kā funkciju no kopējā mitrā svara, gan no kopējā saussvara un, ja nepieciešams (piemēram, izteikti lipofīlām vielām), kā funkciju no sedimentu lipīdu satura un *TOC*. Lipīdu satura noteikšanai jāizmanto piemērotas metodes (48)(49). Par standartmetodi (48) var ieteikt hloroforma/metanola ekstrakcijas metodi (50). Tomēr, lai izvairītos no hloru saturošu šķīdinātāju lietošanas, var izmantot starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā pārbaudītu *Bligh&Dyer* metodes modifikāciju (50), kā aprakstīts (51). Tā kā ar dažādajām metodēm nav iegūstamas identiskas vērtības (48), svarīgi ir detalizēti aprakstīt izmantoto metodi. Kad iespējams, t. i., ja ir pieejams pietiekami daudz tārpu audu, lipīdu saturu mēra tam pašam paraugam vai ekstraktam, ko izmanto testējamās vielas analīzei, jo pirms parauga hromatogrāfiskas analīzes (5) tas nereti jāattīra no lipīdiem. Tomēr, lai izmērītu lipīdu saturu, piemēram, trijos paraugos, praksē ir izdevīgāk vismaz uzņemšanas fāzes sākumā vai – vislabāk – beigās izmantot aklimatizētus kontrolgrupas dzīvniekus.

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

70. Testējamās vielas uzņemšanas līkni iegūst, aritmētiskā skalā testējamās vielas

▼M6

koncentrāciju tārpos vai uz tiem uzņemšanas fāzē atliekot pret laiku. Ja līkne ir sasniegusi plato, aprēķina stacionārā stāvokļa $CBAF_{ss}$:

$$\frac{C_A \text{ stacionārā stāvoklī vai 28. dienā (vidēji)}}{C_S \text{ stacionārā stāvoklī vai 28. dienā (vidēji)}}$$

71. Nosaka kinētisko bioakumulācijas koeficientu *(BAFK)* kā attiecību k_s/k_e. Eliminācijas konstanti (k_e) parasti nosaka pēc eliminācijas līknes (t. i., grafiski parādot testējamās vielas koncentrācijas tārpos eliminācijas fāzes laikā). Pēc tam, pamatojoties uz uzņemšanas līknes kinētiku, aprēķina uzņemšanas ātruma konstanti k_s. Labākā metode *BAFK* un k_s un k_e ātrumu konstanšu iegūšanai ir ar datoru, izmantojot nelineārās parametriskās aplēšanas metodes (skatīt 2. papildinājumu). Ja eliminācija acīmredzami nav pirmās kārtas process, jāizmanto sarežģītāki modeļi (25)(27)(52).

72. Biotas-sedimentu akumulācijas koeficientu *(BSAF)* nosaka, normalizējot *BAFK* attiecībā uz lipīdu saturu tārpos un sedimentu kopējo organiskā oglekļa saturu.

Rezultātu interpretācija

73. Ja izmērītās testējamās vielas koncentrācijas ir tuvas izmantotajai analīzes metodei piemītošajai noteikšanas robežai, rezultāti jāinterpretē piesardzīgi.

74. Skaidri definētas uzņemšanas un eliminācijas līknes liecina par kvalitatīviem bioakumulācijas datiem. Kopumā *BAF* vērtību ticamības robežām labi izplānotos pētījumos nevajadzētu pārsniegt 25 % (5).

Testēšanas pārskats

75. Testēšanas pārskatā jābūt šādai informācijai.

Testējamā viela:

— fizikālais raksturs un fizikālķīmiskās īpašības, piemēram, log K_{ow}, šķīdība ūdenī;

— ķīmiskās identifikācijas dati; testējamās vielas avots, jebkura izmantotā šķīdinātāja identitāte un koncentrācija;

— ja vielu radioaktīvi iezīmē, precīza iezīmēto atomu vieta, īpatnējā radioaktivitāte un ar piemaisījumiem saistītā radioaktivitātes procentuālā daļa.

Testa sugas:

— zinātniskais nosaukums, līnija, avots, jebkāda priekšapstrāde, aklimatizācija, vecums, izmēru diapazons utt.

Testēšanas nosacījumi:

— izmantotā testēšanas procedūra (piemēram, statiska, pusstatiska vai ar caurplūdi);

— izmantotā apgaismojuma veids un rādītāji, kā arī fotoperiods(-i);

— testēšanas plāns (piemēram, testēšanas kameru skaits, materiāls un izmērs, ūdens tilpums, sedimentu masa un tilpums, ūdens tilpuma nomaiņas ātrums (caurplūdē vai pusstatiskās procedūrās), jebkāda aerēšana pirms testa un tā laikā, replikātu skaits, tārpu skaits katrā replikātā, testēšanas koncentrāciju skaits, uzņemšanas fāzes un eliminācijas fāzes ilgums, paraugu ņemšanas biežums);

▼M6

— testējamās vielas sagatavošanas un pievienošanas metode, kā arī konkrētās metodes izraudzīšanās pamatojums;

— nominālās testēšanas koncentrācijas;

— mākslīgā ūdens un sedimentu sastāvdaļu avots vai – ja izmanto dabisku vidi – ūdens un sedimentu izcelsme, jebkādas priekšapstrādes apraksts, jebkādi pierādījumi par testa dzīvnieku spēju dzīvot un/vai vairoties izmantotajā vidē, sedimentu īpašības (poru ūdens pH un amonjaka saturs (dabiskajos sedimentos), organiskā oglekļa saturs *(TOC)*, daļiņu sadalījums pēc lieluma (smilšu, dūņu un mālu procents), procentuālais ūdens saturs un jebkuri citi veiktie mērījumi) un ūdens īpašības (pH, cietība, vadītspēja, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmeņi (ja ir mērīti) un jebkuri citi veiktie mērījumi);

— nominālais un izmērītais mākslīgo sedimentu saussvars procentos no mitrā svara (vai saussvara attiecība pret mitro svaru); attiecībā uz dabā iegūtiem sedimentiem izmērītais sedimentu saussvars procentos no mitrā svara (vai saussvara attiecība pret mitro svaru);

— ūdens kvalitāte testēšanas kamerās, kuru raksturo temperatūra, pH, amonjaka saturs, kopējā cietība un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— detalizēta informācija par ūdens, sedimentu un tārpu paraugu apstrādi, arī par pagatavošanas, glabāšanas un papildināšanas procedūrām, ekstrakciju un analīzes procedūrām (un precizitāti) attiecībā uz testējamo vielu un lipīdu saturu, kā arī testējamās vielas atgūstamību.

Rezultāti:

— kontrolgrupas tārpu mirstība un tārpu mirstība katrā testēšanas kamerā un jebkāda novērota subletāla ietekme, arī anomāla izturēšanās (piemēram, vairīšanās no sedimentiem, ir vai nav fekālās granulas un nevairošanās);

— izmērītais sedimentu un testa organismu saussvars procentos no mitrā svara (vai saussvara attiecība pret mitro svaru) (noder normalizācijai);

— lipīdu saturs tārpos;

— līknes, kas attēlo testējamās vielas uzņemšanas un eliminācijas kinētiku tārpos un laiku, kurš vajadzīgs, lai iestātos stacionārs stāvoklis;

— C_a, C_s un C_w (attiecīgā gadījumā ar standartnovirzi un diapazonu) visiem paraugu ņemšanas laikiem (C_a izteikts g kg^{-1} visa ķermeņa mitrā svara un saussvara, C_s izteikts g kg^{-1} sedimentu mitrā svara un saussvara un C_w izteikts mg l^{-1}). Ja nepieciešams biotas-sedimentu akumulācijas koeficients (*BSAF*; skatīt definīciju 1. papildinājumā) (piemēram, lai salīdzinātu rezultātus, kas iegūti divos vai vairākos testos ar dzīvniekiem, kuriem lipīdu saturs atšķiras), C_a ir papildus jāizsaka kā organisma lipīdu saturs g kg^{-1} un C_s jāizsaka kā sedimentu organiskais ogleklis *(OC)* g kg^{-1};

— *BAF* (izteikts kā kg mitro sedimentu kg^{-1} mitru tārpu), no sedimentiem notiekošās uzņemšanas ātruma konstante k_s (izteikta g mitro sedimentu kg^{-1} mitru tārpu d^{-1}) un eliminācijas ātruma konstante k_e (izteikta kā d^{-1}); atsevišķi var norādīt *BSAF* (izteikts kā kg sedimentu *OC* kg^{-1} lipīdu satura tārpos);

▼**M6**

— neeliminētās atliekas *(NER)* eliminācijas fāzes beigās;

— ja tiek mērīti – testa dzīvnieku organismos konstatētais pamatvielas, noārdīšanās produktu un saistīto atlieku procentuālais īpatsvars (t. i., tās testējamās vielas procents, ko nevar ekstrahēt ar parastajām ekstrakcijas metodēm);

— datu statistiskajā analīzē izmantotās metodes.

Rezultātu izvērtējums:

— rezultātu atbilstība 21. punktā norādītajiem derīguma kritērijiem;

— negaidīti vai netipiski rezultāti, piemēram, nepilnīga testējamās vielas eliminācija no testa dzīvnieku organisma; šādos gadījumos noderīgu informāciju var sniegt jebkura priekšpētījuma rezultāti.

▼M6

1. papildinājums

Definīcijas un mērvienības

Mākslīgie sedimenti jeb pagatavotie, rekonstituētie vai sintētiskie sedimenti ir materiālu maisījums, kurā ir atdarinātas dabisko sedimentu fizikālās sastāvdaļas.

Bioakumulācija ir testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā salīdzinājumā ar testējamās vielas koncentrāciju apkārtējā vidē. Bioakumulācija rodas gan biokoncentrēšanās, gan biopalielināšanās procesā (skatīt turpmāk).

Bioakumulācijas koeficients (*BAF*) šā bioakumulācijas testa uzņemšanas fāzes jebkurā brīdī ir testējamās vielas koncentrācija testa organismā vai uz tā (C_a, izteikts g kg^{-1} mitrā svara vai saussvara), kas dalīta ar vielas koncentrāciju apkārtējā vidē (C_s, izteikts g kg^{-1} sedimentu mitrā svara vai saussvara). Lai varētu izmantot C_a un C_s mērvienības, *BAF* mērvienības ir kg sedimentu kg^{-1} tārpu (15).

Bioakumulācijas koeficientus, kuri tieši aprēķināti no attiecības, ko iegūst, no sedimentiem notiekošās uzņemšanas ātruma konstanti dalot ar eliminācijas ātruma konstantēm (attiecīgi k_s un k_e – skatīt turpmāk), dēvē par kinētisko bioakumulācijas koeficientu (BAF_K).

Biokoncentrēšanās ir tikai caur ķermeņa virsmu notiekošas uzņemšanas radīts testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā salīdzinājumā ar testējamās vielas koncentrāciju apkārtējā vidē.

Biopalielināšanās ir galvenokārt ar piesārņotas barības vai medījuma starpniecību notiekošas uzņemšanas radīts testējamās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā salīdzinājumā ar testējamās vielas koncentrāciju barībā vai medījumā. Biopalielināšanās var izraisīt testējamās vielas pārnesi pa barošanās tīklu vai akumulāciju tajā.

Biotas-sedimentu akumulācijas koeficients *(BSAF)* ir attiecībā uz lipīdiem normalizēta testējamās vielas stacionārā stāvokļa koncentrācija testa organismā vai uz tā, kas dalīta ar attiecībā uz organisko oglekli normalizētu testējamās vielas stacionārā stāvokļa koncentrāciju sedimentos. Tātad C_a izsaka ar g kg^{-1} organisma lipīdu satura un C_s – ar g kg^{-1} sedimentu organiskā satura.

Nogatavināšanas periodu izmanto, lai stabilizētu sedimentu mikrobiālo komponenti un atbrīvotos, piemēram, no amonjaka, kas rodas no sedimentu sastāvdaļām; tas notiek pirms sedimentu papildināšanas ar testējamo vielu. Parasti pēc nogatavināšanas virsējo ūdeni nolej.

Testējamās vielas **eliminācija** ir tāda šīs vielas izzušana no testa organisma audiem ar aktīvu vai pasīvu procesu starpniecību, kas notiek neatkarīgi no tā, vai apkārtējā vidē testējamā viela ir vai nav.

Eliminācijas fāze ir tas laiks pēc testa organismu pārvietošanas no piesārņotas vides uz vidi bez testējamās vielas, kurā pēta šīs vielas eliminmāciju (jeb neto zudumu) no testa organismiem.

Eliminācijas ātruma konstante (k_e) ir skaitliska vērtība, kas raksturo, cik strauji pēc tam, kad testa organismi no testējamo vielu saturošas vides pārvietoti uz vidi bez ķīmiskiem piemaisījumiem, samazinās šīs vielas koncentrācija testa organismā vai uz tā; k_e izsaka ar d^{-1}.

▼M6

Līdzsvarošanās periodu izmanto, lai testējamajai vielai ļautu sadalīties starp cieto fāzi, poru ūdeni un virsējo ūdeni; tas notiek pēc sedimentu papildināšanas ar testējamo vielu un pirms testa organismu pievienošanas.

Oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}) ir vielas šķīdības n-oktanolā un ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī, ko dažreiz izsaka arī kā P_{ow} . K_{ow} logaritmu (log K_{ow}) izmanto par rādītāju vielas bioakumulācijas potenciālam ūdens organismos.

Organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{oc}) ir attiecība starp vielas koncentrāciju sedimentu organiskā oglekļa frakcijā vai uz tās un šīs vielas koncentrāciju ūdenī līdzsvara stāvoklī.

Virsējais ūdens ir ūdens, ar ko testēšanas traukā nosegti sedimenti.

Plato jeb **stacionārs stāvoklis** ir līdzsvars starp uzņemšanas procesu un eliminācijas procesu, kuri vienlaicīgi notiek ekspozīcijas fāzē. *BAF* grafiskajā attēlojumā katrā paraugu ņemšanas periodā stacionārs stāvoklis pret laiku ir sasniegts tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trim pēc kārtas veiktām *BAF* analīzēm ar paraugiem, kas ņemti ar vismaz divu dienu starplaikiem, savstarpējā sakritība ir 20 % robežās, kā arī starp trim paraugu ņemšanas periodiem nav statistiski būtisku atšķirību. Testējamām vielām, ko uzņem lēni, piemērotāki būtu septiņu dienu starplaiki (5).

Poru ūdens jeb starpūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp sedimentu vai augsnes daļiņām.

No sedimentiem notiekošās uzņemšanas ātruma konstante (k_s) ir skaitliska vērtība, kas raksturo, cik strauji pieaug testējamās vielas koncentrācija testa organismā vai uz tā, notiekot uzņemšanai no sedimentu fāzes. k_s izsaka ar g sedimentu kg^{-1} no tārpu d^{-1}.

Papildināti sedimenti ir sedimenti, kam pievienota testējamā viela.

Stacionāra stāvokļa bioakumulācijas koeficients (BAF_{ss}) ir *BAF* stacionārā stāvoklī un ilgākā laikā būtiski nemainās, šajā laikā nemainoties arī testējamās vielas koncentrācijai apkārtējā vidē (C_s kā g kg^{-1} sedimentu mitrā svara vai saussvara).

Uzņemšanas fāze jeb ekspozīcijas fāze ir laiks, kurā testa organismi ir eksponēti testējamai vielai.

▼M6

2. papildinājums

Uzņemšanas un eliminācijas parametru aprēķināšana

Bioakumulācijas testa galvenais beigupunkts ir bioakumulācijas koeficients *BAF*. Izmērīto *BAF* var aprēķināt, stacionārā stāvokļa testējamās vielas koncentrāciju testa organismā C_a dalot ar attiecīgo testējamās vielas koncentrāciju sedimentos C_s. Ja uzņemšanas fāzē stacionārais stāvoklis nav sasniegts, *BAF* tādā pašā veidā aprēķina attiecībā uz 28. dienu. Tomēr ir jānorāda, vai *BAF* pamatā ir vai nav koncentrācijas stacionārā stāvoklī.

Piemērotākais veids, kā iegūt kinētisko bioakumulācijas koeficientu (BAF_K), sedimentu uzņemšanas ātruma konstanti (k_s) un eliminācijas ātruma konstanti (k_e), ir ar datoru, izmantojot nelineārās parametriskās aplēšanas metodes. Ņemot vērā pēc tārpu un sedimentu mitrā svara rēķināto vidējo akumulācijas koeficientu dinamisko rindu (C_a, katra paraugu ņemšanas datuma vidējās vērtības/C_s katra paraugu ņemšanas datuma vidējās vērtības = *AF*) uzņemšanas fāzē un paraugvienādojumu

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[1. vienādojums]}$$

kur AF(t) ir testējamās vielas koncentrācijas tārpos attiecība pret tās koncentrāciju sedimentos jebkurā konkrētā uzņemšanas fāzes laika punktā (t), šīs datorprogrammas aprēķina vērtības BAF_K, k_s un k_e.

Ja uzņemšanas fāzē tiek sasniegts stacionārs stāvoklis (t. i., $t = \infty$), 1. vienādojumu var reducēt uz:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[2. vienādojums]}$$

kur

k_s = uzņemšanas ātruma konstante audos [g sedimentu kg^{-1} tārpu d^{-1}];

k_e = eliminācijas ātruma konstante [d^{-1}].

Tādā gadījumā $k_s/k_e \times C_s$ ir metode, kā noteikt testējamās vielas koncentrāciju tārpu audos stacionārā stāvoklī ($C_{a,ss}$).

Biotas-sedimentu akumulācijas koeficientu *(BSAF)* aprēķina šādi:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

kur f_{oc} ir sedimentu organiskā oglekļa frakcija un f_{lip} ir lipīdu frakcija tārpos, abi vai nu uz saussvara, vai mitrā svara bāzes.

Pamatojoties uz koncentrācijas vērtību dinamisko rindu, var modelēt eliminācijas kinētiku, izmantojot turpmāk minētos paraugvienādojumus un datora aprēķinus ar nelineāro parametru aplēšanas metodi.

Par noklusējuma sākumpunktu ieteicams izmantot uzņemšanas fāzes beigās izmērītās vidējās atliekas ķermenī. Ja, piemēram, izmērītā vērtība būtiski atšķiras no ķermenim modelētās atlieku vērtības, jālieto tikai no uzņemšanas fāzes modelētās/aplēstās vērtības. Skatīt arī 50. punktu attiecībā uz eliminācijai paredzēto tārpu pirmsekspozīcijas alternatīvu; šajā pieejā tiek uzskatīts, ka no paraugiem ar minētajiem provizoriski eksponētajiem tārpiem eliminācijas fāzes 0. dienā iegūstamas reālistiskas ķermenī konstatējamo atlieku vērtības, ar kurām var uzsākt eliminācijas kinētikas aprēķinus.

▼M6

Ja attiecībā pret laiku grafikā atliktie datu punkti liecina, ka testējamās vielas koncentrācija dzīvnieku organismā nepārtraukti eksponenciāli samazinās, eliminācijas norisi laikā var aprakstīt, izmantojot viena segmenta modeli (4. vienādojums).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[3. vienādojums]}$$

Izrādās, ka eliminācijas procesi dažkārt ir divfāzu procesi, kur sākumposmos novēro C_a strauju samazināšanos, kas mainās uz testējamās vielas lēnāku zudumu eliminācijas vēlākās fāzēs (8)(19)(25). Abas fāzes var interpretēt ar pieņēmumu, ka organismā ir divi atšķirīgi segmenti, no kuriem testējamā viela izzūd atšķirīgā ātrumā. Šādos gadījumos ir jāpētī nozares literatūra (15)(16)(17)(25).

Divsegmentu eliminmāciju apraksta, piemēram, šāds vienādojums (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[4. vienādojums]}$$

A un B raksturo šo segmentu lielumu (procentos no kopējām atliekām audos), kur A ir segments ar straujiem vielas zudumiem, bet B ir segments, no kura testējamā viela izzūd lēni. A un B summa ir vienāda ar 100 % visa dzīvnieka segmentu tilpuma stacionārā stāvoklī. k_a un k_b ir attiecīgās eliminācijas konstantes [d^{-1}]. Pielāgojot divsegmentu modeli attīrīšanās datiem, uzņemšanas ātruma konstanti k_s var noteikt šādi (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[5. vienādojums]}$$

Tomēr šie paraugvienādojumi ir jāizmanto piesardzīgi, jo īpaši gadījumos, kur testa laikā mainās testējamās vielas biopieejamība (42).

Kā alternatīvu iepriekš minētajiem paraugvienādojumiem kinētikas parametrus (k_s un k_e) var aprēķināt arī kopā, piemērojot pirmās kārtas kinētikas modeli kopā visiem datiem gan no uzņemšanas fāzes, gan eliminācijas fāzes. Attiecībā uz metodi, ar kuru būtu iespējams šādi kombinēti aprēķināt uzņemšanas ātruma un eliminācijas ātruma konstantes, var iepazīties ar literatūras avotiem (55)(56)(57).

Neeliminētās atliekas *(NER)* aprēķina kā sekundāru parametru, reizinot ar 100 attiecību starp vidējo vielas koncentrāciju tārpos (C_a) eliminācijas fāzes 10. dienā un vidējo koncentrāciju tārpos (C_a) stacionārā stāvoklī (uzņemšanas fāzes 28. dienā):

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ eliminācijas fāzes beigās}(\text{vidējā}) \times 100}{C_a \text{ stacionārā stāvoklī}(\text{vidējā})}}$$

▼M6

3. papildinājums

Paraugu ņemšanas grafika paraugs 28 dienu bioakumulācijas testam

a) **Uzņemšanas fāze (arī četras dienas ilgs līdzsvarošanās posms)**

Diena	Darbība
-6	Kūdras suspensijas pagatavošana sedimentiem; šīs suspensijas nogatavināšana 48 stundas.
-4	Sedimentu vai sedimentu frakcijas papildināšana ar testējamo vielu; visu sedimentu sastāvdaļu samaisīšana; apstrādāto sedimentu paraugu un šķīdinātāja kontrolgrupas sedimentu paraugu izņemšana testējamo vielu koncentrācijas noteikšanai; virsējā ūdens pievienošana; inkubācija testēšanas apstākļos (līdzsvarošanās posms).
-3/-2	Testa organismu atdalīšana no kultūras aklimatizācijas nolūkā.
0	Ūdens kvalitātes mērīšana (sk. 52. punktu); replikātu izņemšana nolūkā ņemt ūdens un sedimentu paraugus testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai; tārpu sadalīšana pa testēšanas kamerām pēc nejaušības principa; pietiekamu tārpu apakšparaugu saglabāšana analītisko fona vērtību noteikšanai; gaisa padeves kontrolēšana slēgta tipa testēšanas sistēmu lietošanas gadījumā.
1	Replikātu izņemšana paraugu ņemšanai; gaisa padeves, tārpu izturēšanās un ūdens kvalitātes kontrolēšana (sk. 56. punktu); ūdens, sedimentu un tārpu paraugu ņemšana testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai.
2	Gaisa padeves, tārpu izturēšanās un temperatūras kontrole.
3	Tāpat kā 1. dienā.
4 – 6	Tāpat kā 2. dienā.
7	Tāpat kā 1. dienā; ūdens papildināšana iztvaikojušā vietā, ja nepieciešams.
8 – 13	Tāpat kā 2. dienā.
14	Tāpat kā 1. dienā; ūdens papildināšana iztvaikojušā vietā, ja nepieciešams.
15 – 20	Tāpat kā 2. dienā.
21	Tāpat kā 1. dienā; ūdens papildināšana iztvaikojušā vietā, ja nepieciešams.
22 – 27	Tāpat kā 2. dienā.
28	Tāpat kā 1. dienā; ūdens kvalitātes mērīšana (skatīt 52. punktu); uzņemšanas fāzes beigas; pietiekami lielu tārpu paraugu daļu saglabāšana analītisko fona vērtību noteikšanai; mitrais svars un saussvars un lipīdu saturs; tārpu pārvietošana no atlikušajiem eksponētajiem replikātiem uz tīrus sedimentus saturošiem traukiem eliminācijas fāzes vajadzībām (bez zarnu attīrīšanas); ūdens, sedimentu un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem; šķīduma paraugu ņemšana no lamatām, ja tādas ir uzstādītas.
	Pirmsekspozīcijas darbības (līdzsvarošanās posms) jāplāno, ņemot vērā testējamās vielas īpašības. Ja nepieciešams, pagatavoto sedimentu nogatavināšana zem virsējā ūdens 20 ± 2 °C temperatūrā septiņas dienas; šādā gadījumā sediments jāsagatavo laikus!
	Otrajā dienā paredzētās darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdienās).

▼M6

b) **Eliminācijas fāze**

Diena	Darbība
-6	Kūdras suspensijas pagatavošana sedimentiem; šīs suspensijas nogatavināšana 48 stundas.
-4	Visu sedimentu sastāvdaļu samaisīšana; apstrādāto sedimentu paraugu un šķīdinātāja kontrolgrupas sedimentu paraugu izņemšana testējamo vielu koncentrācijas noteikšanai; virsējā ūdens pievienošana; inkubācija testēšanas apstākļos.
0 (uzņemšanas fāzes 28. diena)	Ūdens kvalitātes mērīšana (sk. 52. punktu); tārpu pārvietošana no atlikušajiem eksponētajiem replikātiem uz traukiem, kas satur tīrus sedimentus; pēc **4 – 6 stundām** replikātu izņemšana nolūkā ņemt ūdens, sedimentu un tārpu paraugus testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai; tārpu sadalīšana pa testēšanas kamerām pēc nejaušības principa.
1	Replikātu izņemšana paraugu ņemšanai; gaisa padeves, tārpu izturēšanās un ūdens kvalitātes kontrole (sk. 52. punktu); ūdens, sedimentu un tārpu paraugu ņemšana testa vielas koncentrācijas noteikšanai.
2	Gaisa padeves, tārpu izturēšanās un temperatūras kontrolēšana.
3	Tāpat kā 1. dienā.
4	Tāpat kā 2. dienā.
5	Tāpat kā 1. dienā.
6	Tāpat kā 2. dienā.
7	Tāpat kā 1. dienā; ūdens papildināšana iztvaikojušā vietā, ja nepieciešams.
8 – 9	Tāpat kā 2. dienā.
10	Tāpat kā 1. dienā; eliminācijas fāzes beigas; ūdens kvalitātes mērīšana (sk. 52. punktu); ūdens, sedimentu un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem; šķīdumu paraugu ņemšana no lamatām, ja tādas ir uzstādītas.
	Sedimentu pagatavošana pirms eliminācijas fāzes sākuma jāveic tāpat kā pirms uzņemšanas fāzes.
	Otrajā dienā paredzētās darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdienās).

▼**M6**

4. papildinājums

Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens fizikālķīmiskās īpašības

SASTĀVDAĻA	KONCENTRĀCIJAS
Cietās daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2μg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 μg/l
Atlikušais hlors	< 10 μg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

IETEICAMAIS REKONSTITUĒTĀ ŪDENS SASTĀVS

a) Kalcija hlorīda šķīdums

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 11,76 g $CaCl_2$ 2 H_2O; ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l.

b) Magnija sulfāta šķīdums

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 4,93 g $MgSO_4$ 7 H_2O; ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l.

c) Nātrija bikarbonāta šķīdums

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 2,59 g $NaHCO_3$; ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l.

d) Kālija hlorīda šķīdums

Dejonizētā ūdenī izšķīdina 0,23 g KCl; ar dejonizētu ūdeni papildina līdz 1 l.

Visām ķīmiskajām vielām jābūt analītiski tīrām.

Destilētā vai dejonizētā ūdens vadītspēja nedrīkst pārsniegt 10 μScm^{-1}.

Samaisa 25 ml katra a) – d) šķīduma, un kopējo tilpumu papildina ar dejonizētu ūdeni līdz 1 l. Kalcija un magnija jonu summa šajā šķīdumā ir 2,5 mmol/l.

Ca:Mg jonu proporcija ir 4:1, bet Na:K joniem – 10:1. Šā šķīduma skābju neitralizētspēja $K_{S4.3}$ ir 0,8 mmol/l.

Atšķaidīšanas ūdeni aerē, līdz sasniegts piesātinājums ar skābekli, tad pirms lietošanas aptuveni divas dienas glabā bez turpmākas aerācijas.

Pieņemama atšķaidīšanas ūdens pH jābūt diapazonā no 6 līdz 9.

▼M6

5. papildinājums

Mākslīgie sedimenti – pagatavošanas un glabāšanas ieteikumi

Pretēji prasībām, ko piemēro testēšanas metodei C.8. (40), mākslīgajiem sedimentiem ieteicamais kūdras saturs ir 2 %, nevis 10 % saussvara, lai tas atbilstu zemam līdz vidējam organiskajam saturam dabiskajos sedimentos (58).

Mākslīgo sedimentu sauso sastāvdaļu procentuālais īpatsvars

Sastāvdaļa	Īpašības	Sausie sedimenti (%)
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, sadalīšanās pakāpe – "vidēja", kaltēta, bez redzamām augu paliekām, smalki sasmalcināta (daļiņu izmērs≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvarca smiltis	Graudu izmērs ≤ 2 mm, bet > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā	76
Kaolinīta māls	Kaolinīta saturs ≥ 30 %	22 ± 1
Barības avots	papildus sausajiem sedimentiem *Folia urticae*, pulverī saberztas *Urtica sp.* (nātru) lapas, smalki samaltas (daļiņu izmērs≤ 0,5 mm), vai pulverī saberztas *Urtica sp.* lapas maisījumā ar alfa-celulozi (1:1); saskaņā ar farmācijas standartiem, lietošanai pārtikā;	0,4–0,5 %
Kalcija karbonāts	$CaCO_3$, pulverveida, ķīmiski tīrs, papildus sausajiem sedimentiem	0,05–1
Dejonizēts ūdens	Vadītspēja ≤ 10 μS/cm, papildus sausajiem sedimentiem	30–50

Ja paredzamas paaugstinātas amonjaka koncentrācijas, piemēram, ja zināms, ka testējamā viela aizkavē nitrifikāciju, var būt lietderīgi 50 % ar slāpekli bagātā *Urtica* pulvera aizstāt ar celulozi (piemēram, ar α-celulozes pulveri, kas ir ķīmiski tīrs, daļiņu izmērs ≤ 0,5 mm).

Pagatavošana

Kūdru izžāvē gaisā un saberž smalkā pulverī (graudu lielums ≤ 0,5 mm, bez redzamām augu paliekām). Ar augsti iedarbīgu homogenizācijas ierīci pagatavo suspensiju ar nepieciešamo kūdras pulvera daudzumu, izmantojot dejonizēta ūdens porciju, kuru pievieno sausajiem sedimentiem (tiek atzīts, ka samaisāmas kūdras putriņas iegūšanai piemērotais ūdens tilpums ir 11,5 × kūdras saussvara(8)).

Šīs suspensijas pH ar $CaCO_3$ koriģē līdz vērtībai 5,5 ± 0,5. Suspensiju nogatavina vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobiālo komponenti. Vēlreiz izmēra pH un, ja nepieciešams, to ar $CaCO_3$ koriģē līdz 6,0 ± 0,5. Tad visu šo suspensiju samaisa ar citām sausajām sastāvdaļām, ņemot vērā jebkādu daudzumu, kas izmantots papildināšanai ar ķīmisko vielu. Pievieno atlikušo dejonizēto ūdeni, iegūstot viendabīgus sedimentus. Vēlreiz izmēra pH un, ja nepieciešams, to ar $CaCO_3$ koriģē līdz 6,5–7,5. Tomēr, ja ir paredzama amonjaka veidošanās, sedimentu pH var būt lietderīgi saglabāt zem 7,0 (piemēram, no 6,0 līdz 6,5). Ņem sedimentu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Ja ir paredzams, ka veidosies amonjaks, mākslīgos sedimentus septiņas dienas var nogatavināt tādos pašos apstākļos, kādus rada turpmākajam testam (piemēram, ar sedimentu un ūdens attiecību 1:4 un tādu pašu sedimentu slāņa augstumu kā testēšanas traukos), pirms tos papildina ar testējamo vielu, t. i., tie ir jāpārlej ar ūdeni, kuru iepriekš aerē. Nogatavināšanas perioda beigās virsējo ūdeni nolej un izlej. Ņem sedimentu paraugus, lai noteiktu saussvaru un kopējo organiskā oglekļa saturu (piemēram, trīs paraugus).

▼M6

Pēc tam papildinātās kvarca smiltis katram apstrādes līmenim sajauc ar sedimentiem un sedimentus sadala pa replikātu testēšanas traukiem, pārlejot ar testēšanas ūdeni (piemēram, sedimentu un ūdens attiecībā 1:4 un tādu pašu sedimentu slāņa augstumu kā testēšanas traukos). Tad šos traukus inkubē tādos pašos apstākļos, kādus rada turpmākajam testam. Tajā brīdī sākas līdzsvarošanas periods. Virsējais ūdens jāaerē.

Izraudzīto barības avotu pievieno pirms sedimentu papildināšanas ar testējamo vielu vai tās laikā. To var iepriekš samaisīt ar kūdras suspensiju (skatīt iepriekš). Savukārt, iespējami saīsinot periodu starp barības pievienošanu un ekspozīcijas sākumu, var novērst, ka barības avots pārmērīgi noārdās pirms testa organismu pievienošanas – piemēram, ilga līdzsvarošanās perioda gadījumā. Lai nodrošinātu, ka barība pietiekami saskaras ar testējamo vielu, tās avots ar sedimentiem jāsamaisa ne vēlāk kā dienā, kad sedimentus papildina ar testējamo vielu. Izņēmumus var pieļaut tad, ja ilgstošais līdzsvarošanas periods izraisa pārmērīgu mikroorganismu noārdīšanos barībā pirms testa organismu pievienošanas. Ņem sedimentu paraugus, lai noteiktu saussvaru un kopējo organiskā oglekļa saturu (piemēram, trīs paraugus ar papildinātiem vai kontrolgrupas sedimentiem).

Sastāvdaļu (kūdras, smilšu un kaolīna) saussvars jānorāda gramos un procentos no kopējā saussvara.

Ūdens tilpums, kas jāpievieno sausajām sastāvdaļām sedimentu pagatavošanas laikā, arī jāizsaka procentos no kopējā saussvara (piem., 100 % saussvara + 46 % ūdens nozīmē, ka 1 000 g saussvara uzņem kopumā 460 ml ūdens, izveidojoties 1 460 g mitru sedimentu).

Glabāšana

Mākslīgo sedimentu sausās sastāvdaļas var glabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Pagatavotos mitros sedimentus (tikai turpmākai lietošanai kultūrā) 4 ± 2 °C temperatūrā un tumsā var glabāt 2 līdz 4 nedēļas, skaitot no pagatavošanas dienas (8).

Ar testējamo vielu papildināti sedimenti jāizmanto nekavējoties, ja vien nav pieejama informācija, kas liecina, ka konkrētos sedimentus var glabāt, neietekmējot testējamās vielas toksicitāti un biopieejamību. Papildināto sedimentu paraugus tādos apstākļos, kas ieteikti konkrētajai testējamajai vielai, var glabāt līdz analīzes veikšanai.

▼M6

6. papildinājums

Bioakumulācijas testēšanai ieteicamās mazsartārpu sugas

Tubifex tubifex (MÜLLER)*, stobriņtārpu dzimta *(Tubificidae)*, mazsartārpu klase *(Oligochaeta)

Stobriņu mazsartārpi (stobriņtārpu dzimta *(Tubificidae)*, mazsartārpu klase *(Oligochaeta)*) *Tubifex tubifex (Müller)* dzīvo saldūdens sedimentos stobriņos, kas izklāti ar gļotām. Šajos stobriņos tārpi mīt ar galvu uz leju un barojas ar sedimentu daļiņām, proti, ar saistītajiem mikroorganismiem un organiskajām atliekām. Elpošanu nodrošina organisma pakaļējā daļa, kas parasti viļņojas virs sedimentiem esošā ūdens slānī. Kaut arī šī suga apdzīvo visdažādāko veidu sedimentus visā ziemeļu puslodē, *Tubifex tubifex* dod priekšroku samērā smalkiem sedimentiem (59). Minētās sugas piemērotība ekotoksikoloģijas testiem ir raksturota, piemēram, (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Kultivēšanas metodes

Lai pietiktu *Tubifex tubifex* tārpu bioakumulācijas testu veikšanai, tie jātur pastāvīgā laboratoriskā kultūrā. *T. tubifex* kultūrai ir ieteicama sistēma, kas sastāv no mākslīgiem sedimentiem, kuru bāze ir mākslīgā augsne saskaņā ar testēšanas metodi C.8. (40) un rekonstituētais ūdens saskaņā ar testēšanas metodi C.1. (8).

Par kultivēšanas traukiem var izmantot stikla vai nerūsošā tērauda tvertnes ar augstumu no 12 līdz 20 cm. Visas kultivēšanas tvertnes piepilda ar mitru mākslīgo sedimentu slāni, kas pagatavots saskaņā ar 5. papildinājumu. Sedimentu slāņa dziļumam jānodrošina tārpu dabiskā izturēšanās – ierakšanās – (tārpiem *T. tubifex* minimālais dziļums 2 cm). Sistēmai pielej rekonstituētu ūdeni. Jāparūpējas, lai līdz minimumam samazinātu sedimentu sajaukšanos. Ūdens masu viegli aerē (piemēram, divi burbuļi sekundē ar 0,45 μm filtrēta gaisa), izmantojot Pastēra pipeti, kas novietota 2 cm virs sedimentu virsmas. Ieteicamā kultūras temperatūra ir 20 ±2 °C.

Tārpus pievieno kultūras sistēmai tā, lai noslogojums nepārsniegtu 20 000 īpatņu uz 1 m^2 sedimentu virsmas. Lielāks noslogojums var mazināt augšanas un vairošanās tempu (43).

Mākslīgo sedimentu kultūrās tārpi ir jābaro. Par papildu barības vielu var izmantot smalki saberztu zivju barību, piemēram, *TetraMin*® (8); *Klerks 1994*, *personal communication*. Barošanas intensitātei jānodrošina pietiekama augšana un vairošanās, un amonjaka veidošanās un sēnīšu augšana kultūrā jāierobežo līdz minimumam. Barošanu var veikt divreiz nedēļā (piemēram, 0,6–0,8 mg uz 1 cm^2 sedimentu virsmas). Praktiskā pieredze liecina, ka dejonizētā ūdenī suspendētas un homogenizētas barības izmantošana var atvieglot vienmērīgu barības izkliedi kultūras tvertnēs pa sedimentu virsmu.

Lai virsējā ūdenī neuzkrātos amonjaks, ūdens jāmaina, izmantojot caurplūdes sistēmu vai – vismaz vienreiz nedēļā – to izdarot manuāli. Izejkultūrās sedimenti jāmaina ik pēc trim mēnešiem.

Ja nepieciešami tikai pieauguši tārpi, tos no kultūras paraugiem var ņemt, kultūras sedimentus izlaižot caur 1 mm sietu. Kokonu ievākšanai piemēroti būs sieti ar 0,5 mm acīm, bet jauno indivīdu ievākšanai – ar 0,25 mm. Pēc tam, kad caur sietiem izlaisti sedimenti, sietus var ievietot rekonstituētā ūdenī. Tārpi no sieta atlīp, un tad tos var izņemt no ūdens ar mīksta tērauda pinceti vai pipeti ar rūdīta stikla malām.

▼M6

Testa vai jaunu kultūru sākšanai izmanto tikai veselus un skaidri identificētus *Tubifex tubifex* īpatņus (piemēram, (64)). Slimi vai ievainoti tārpi, kā arī ar sēnīšu hifu inficēti kokoni būs jālikvidē.

Sinhronizētā kultivēšanā var piemērotos starplaikos pēc vēlēšanās iegūt konkrēta vecuma tārpus. Jaunus kultivēšanas traukus uzstāda izraudzītos starplaikos (piemēram, ik pēc divām nedēļām), sākot ar noteikta vecuma dzīvniekiem (piemēram, kokoniem). Šeit minētajos kultivēšanas apstākļos tārpi ir pieauguši pēc 8–10 nedēļām. Kultūras var ievākt, kad tārpi ir radījuši jaunus kokonus, piemēram, pēc desmit nedēļām. Paraugam ņemtos pieaugušos tārpus var izmantot testēšanai, un ar kokoniem var uzsākt jaunas kultūras veidošanu.

Lumbriculus variegatus (MÜLLER)*, ūdensslieku dzimta *(Lumbriculidae)*, mazsartārpu klase *(Oligochaeta)

Lumbriculus variegatus (ūdensslieku dzimta *(Lumbriculidae)*, mazsartārpu klase *(Oligochaeta)*) arī mīt saldūdens sedimentos visā pasaulē, un tos plaši izmanto ekotoksikoloģiskajos testos. Informācija par šīs sugas bioloģiju, kultivēšanas apstākļiem un jutīgumu atrodama (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* ar noteiktiem ierobežojumiem var kultivēt arī mākslīgajos sedimentos, kas ieteicami *T. tubifex* (8). Tā kā dabā *L. variegatus* dod priekšroku rupjākiem sedimentiem nekā *T. tubifex* (59), laboratorijas kultūras ar mākslīgajiem sedimentiem, ko izmanto *T. tubifex*, 4–6 mēnešu laikā var izbeigties. Praktiskā pieredze liecina, ka *L. variegatus* smilšainā substrātā (piem., kvarca smiltīs, smalkā grantī) ar caurplūdes sistēmu, barojot ar zivju barību, bez substrāta atjaunošanas var turēt vairākus gadus. Salīdzinot ar citām ūdens mazsartārpu sugām, galvenā *L. variegatus* priekšrocība ir straujā vairošanās, kas dod iespēju ātri palielināt biomasu laboratorijā kultivētām populācijām (1)(6)(9)(10).

Kultivēšanas metodes

Lumbriculus variegatus kultivēšanas apstākļi ir detalizēti aprakstīti *Phipps et al. (1993)* (10), *Brunson et al. (1998)* (28), *ASTM (2000)* (1) un *U.S. EPA (2000)* (6). Turpmāk sniegts īss kopsavilkums par šiem apstākļiem.

Tārpus var kultivēt lielos akvārijos (57–80 l) 23 °C temperatūrā ar fotoperiodu 16 h gaismas:8 h tumsas (100–1 000 luksi), izmantojot katru dienu atjaunināto dabisko ūdeni (45–50 l uz vienu akvāriju). Substrātu pagatavo, nebalināta brūna papīra dvieļus sagriežot strēmelēs, ko pēc tam var dažas sekundes sakult ar kultūras ūdeni, iegūstot nelielu papīra gabaliņu substrātu. Šo substrātu pēc tam var tieši izmantot *Lumbriculus* kultūras akvārijā, ar to izklājot tvertnes apakšdaļu, vai dejonizētā ūdenī sasaldētu glabāt vēlākai lietošanai. Ar jauno substrātu tvertnē parasti pietiek aptuveni divus mēnešus.

Katru tārpu kultūru sāk ar 500–1 000 tārpiem un trīs reizes nedēļā, nodrošinot ūdens atjaunināšanu vai caurplūdi, baro ar 10 ml suspensiju, kas satur 6 g foreļu kāpuru barības. Lai nepieļautu baktēriju un sēnīšu augšanu, statiskās vai pusstatiskas kultūrās barību dod retāk. Barību un papīra substrātu analizē attiecībā uz bioakumulācijas testos izmantojamu vielu klātbūtni.

Šādos apstākļos īpatņu skaits kultūrā aptuveni 10–14 dienās parasti dubultojas.

Lumbriculus variegatus no kultūrām izņem, piemēram, uz atsevišķu vārglāzi ar smalku tīkliņu pārvietojot substrātu vai ar rūdīta stikla pipeti ar platu atvērumu (aptuveni 5 mm diametrā) – organismus. Ja uz šo vārglāzi pārvieto arī substrātu, tārpus un substrātu saturošo vārglāzi pa nakti atstāj caurplūdē, kura substrātu atdalīs no vārglāzes, tārpiem paliekot trauka apakšā. Pēc tam tārpus var ielaist kultūras tvertēs, kas sagatavotas no jauna, vai tālāk sagatavot testa vajadzībām(1)(6). Nedrīkst pieļaut tārpu savainošanu vai to autotomiju, piemēram, darbā ar tārpiem jāizmanto pipetes ar rūdīta stikla malām vai nerūsošā tērauda irbuļi.

Problēma, kas kritiski jāvērtē, sedimentu bioakumulācijas testos izmantojot *L. variegatus*, ir šīs sugas vairošanās veids (arhitomija, kam seko morfalakse). Šāda

▼M6

bezdzimumvairošanās rezultējas divos fragmentos, kuri kādu laiku neuzņem barību, kamēr reģenerējas galvas vai astes daļa (36)(37). Tas nozīmē, ka sugas *L. variegatus* tārpi sedimentus un piesārņotājus ar barības starpniecību neuzņem pastāvīgi kā stobriņtārpi, kuri nevairojas fragmentējoties.

Tādēļ ir jāveic sinhronizācija, lai nekontrolētu vairošanos un reģenerēšanos un attiecīgi – būtiskas atšķirības testa rezultātos – samazinātu līdz minimumam. Šādas atšķirības var rasties tad, ja daži īpatņi, kas sadalījušies fragmentos un tādēļ noteiktu laiku neuzņem barību, testējamajai vielai ir eksponēti mazāk nekā citi īpatņi, kas testa laikā fragmentos nesadalās (38). 10–14 dienas pirms ekspozīcijas sākuma tārpi ir jāsadala mākslīgi (sinhronizācija) (65). Jāizmanto lieli tārpi, vislabāk tādi, kuriem nav nesenas fragmentācijas pazīmju. Šos tārpus var novietot uz stikla priekšmetstikliņa kultūras ūdens pilienā un ķermeņa vidusdaļā ar skalpeli pārdalīt uz pusēm. Jāraugās, lai pakaļgali būtu līdzīga izmēra. Pēc tam pakaļgalus jaunu galvu reģenerēšanai līdz ekspozīcijas sākumam atstāj kultivēšanas traukos, kas satur tādu pašu substrātu, kāds izmantots kultūrā, un rekonstituētu ūdeni. Par jaunu galvu reģenerēšanos liecina sinhronizēto tārpu ierakšanās substrātā (reģenerēto galvu esamību var pārbaudīt, reprezentatīvu apakšparaugu apskatot binokulārā mikroskopā). Pēc tam sagaidāms, ka testa organismi būs vienādā fizioloģiskā stāvoklī. Tas nozīmē, ka tad, kad testa laikā sinhronizētajiem tārpiem notiek morfalakses izraisītā reģenerācija, sagaidāms, ka praktiski visi dzīvnieki ar ķīmisko vielu papildinātajiem sedimentiem bijuši eksponēti vienādā mērā. Sinhronizētie tārpi jābaro, tiklīdz tie sāk ierakties substrātā, vai septiņas dienas pēc to sadalīšanas. Barošanas režīmam jābūt salīdzināmam ar parastajām kultūrām, taču sinhronizētos tārpus ieteicams barot no tā paša barības avota, ko paredzēts lietot testēšanā. Tārpi jātur testēšanas temperatūrā, proti, 20 ± 2 °C. Pēc reģenerācijas testēšanā izmanto neskartus un veselus līdzīga izmēra tārpus, kas aktīvi peld vai lien, reaģējot uz vieglu mehānisku kairinājumu. Nedrīkst pieļaut tārpu savainošanu vai to autotomiju, piemēram, darbā ar tārpiem jāizmanto pipetes ar rūdīta stikla malām vai nerūsošā tērauda irbuļi.

Ja testam izmanto *Lumbriculus variegatus*, ņemot vērā šīs sugas īpašo vairošanās veidu, piemērotos apstākļos testa laikā tārpu skaitam jāpieaug (6. literatūras avots). Bioakumulācijas testā ar *L. variegatus* nevairošanās fakts jāatspoguļo pārskatā un jāņem vērā, interpretējot testa rezultātus.

***Branchiura sowerbyi (BEDDARD)*, stobriņtārpu dzimta *(Tubificidae)*, mazsartārpu klase *(Oligochaeta)* (starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā nav apstiprināti)**

Suga *Branchiura sowerbyi* cēlusies tropiskos apgabalos un apdzīvo dažāda veida sedimentus ūdenstilpēs, ezeros, dīķos un upēs. Tā ir sastopama arī ziemeļu puslodes siltajās ūdenstilpēs. Tomēr daudz bagātīgāk tā ir pārstāvēta dūņu un māla sedimentos ar augstu organisko vielu saturu. Turklāt tārpi dzīvo sedimentu slānī. Sedimentos parasti ieracies ir arī pakaļgals. Šo sugu viegli atpazīt pēc žaunu pavedieniem mugurpusē. Pieauguši tārpi var sasniegt 9–11 cm garumu

▼**M6**

un mitro svaru 40–50 mg. Tārpi strauji vairojas, un, temperatūrai un barošanai atbilstot turpmāk minētajiem nosacījumiem, to populācija mazāk nekā divās nedēļās dubultojas (*Aston et al. 1982*, (65)). *B. sowerbyi* izmanto gan toksicitātes, gan bioakumulācijas pētījumos (attiecīgi *Marchese & Brinkhurst 1996* (31) un *Roghair et al. 1996*, (67)).

Kultivēšanas metodes

Turpmāk ir sniegts kopsavilkums par *Branchiura sowerbyi* kultivēšanas apstākļiem (sagatavojuši *Mercedes R. Marchese, INALI,* Argentīna, un *Carla J. Roghair, RIVM,* Nīderlande).

Testa organismu kultivēšanai nav nepieciešama viena noteikta metodika. Šos organismus var kultivēt, izmantojot nepiesārņotus dabiskos sedimentus (31). Praktiskā pieredze liecina, ka vidē, kas sastāv no dabiskiem sedimentiem un smiltīm, tārpu stāvoklis ir labāks nekā tikai dabiskos sedimentos (32)(67). Kultivēšanai var izmantot trīs L vārglāzes, kas satur 1 500 ml sedimentu/ūdens vides, kuras sastāvā ir 375 ml dabisku nepiesārņotu sedimentu (kopējais organiskais ogleklis aptuveni 10 %; aptuveni 17 % daļiņu ≤ 63 μm), 375 ml tīru smilšu (M32) un 750 ml rekonstituēta vai no hlora attīrīta krāna ūdens (31)(32)(67). Par kultivēšanas substrātu var izmantot arī papīra dvieļus, taču populācijas pieaugums būs lēnāks nekā dabiskajos sedimentos. Pusstatiskās sistēmās ūdens slāni vārglāzē lēni aerē, un virsējais ūdens ir jāatjaunina katru nedēļu.

Katrā vārglāzē kultūras aizsākšanai ievieto 25 jaunus tārpus. Pēc diviem mēnešiem lielos tārpus ar pinceti izņem no sedimentiem un ievieto jaunā vārglāzē ar svaigi pagatavotu sedimentu/ūdens vidi. Vecajā vārglāzē atrodas arī kokoni un jaunie indivīdi. Šādi no katras vārglāzes var iegūt līdz 400 tārpu mazuļiem. Pieaugušos tārpus reprodukcijai izmantot var vismaz vienu gadu.

Kultūras uztur 21–25 °C temperatūrā. Temperatūras svārstības saglabā ± 2 °C robežās. Laiks, kas nepieciešams embriju attīstībai no oliņas izdēšanas līdz brīdim, kad jaunie tārpi pamet kokonu, ir aptuveni trīs nedēļas 25 °C temperatūrā. Ir konstatēts, ka oliņu daudzums, ko iegūst no katra izdzīvojušā *B. sowerbyi* tārpa, svārstās no 6,36 (31) līdz 11,2 (30) dūņās 25 °C temperatūrā. Oliņu skaits uz vienu kokonu svārstās no 1,8 līdz 2,8 (66)(69) vai līdz 8 (68).

Katru izšķīdušo skābekli, ūdens cietību, temperatūru un pH mēra katru nedēļu. Zivju barību (piemēram, *TetraMin*®) var divas vai trīs reizes nedēļā pievienot kā suspensiju *ad libitum*. Tārpus var *ad libitum* barot arī ar atkausētām salātlapām.

Šīs sugas galvenā priekšrocība ir liela individuālā biomasa (viena īpatņa mitrais svars līdz 40–50 mg). Tādēļ šo sugu var izmantot bioakumulācijas testēšanai attiecībā uz testējamajām vielām, kas nav radioaktīvi iezīmētas. To var eksponēt sistēmās, ko izmanto ar *T. tubifex* vai *L. variegatus,* katrā replikātā izmantojot vienu īpatni (11). Tomēr tādā gadījumā ir jāpalielina replikātu skaits, ja vien neizmanto lielākas testēšanas kameras (11). Šai sugai jākoriģē arī derīguma kritērijs, kas saistīts ar ierakšanos.

▼**M6**

LITERATŪRA

(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) Šā pielikuma C.13. nodaļa "Biokoncentrācija – zivju analīze caurplūdes apstākļos"

(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) Šā pielikuma C.27. nodaļa "Toksicitātes tests ar nosēdumu un ūdens hironomīdiem, izmantojot piesātinātus nosēdumus".

(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) Šā pielikuma nodaļas

A.4. nodaļa "Tvaika spiediens"

A.4. nodaļa "Virsmas spraigums"

A.6. nodaļa "Šķīdība ūdenī"

A.8. nodaļa "Sadalīšanās koeficients, kolbu kratīšanas metode"

A.24. nodaļa "Sadalīšanās koeficients, *HPLC* metode"

C.7. nodaļa "Noārdīšanās – abiotiska noārdīšanās: hidrolīze atkarībā no pH"

C.4. nodaļa " "Vieglas" bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana, A–F"

C.19. nodaļa "Adsorbcijas koeficienta (K_{OC}) noteikšana uz augsnes un uz kanalizācijas nosēdumiem ar augstas izšķiršanas šķidruma hromatogrāfiju (*HPLC*)"

C.29. nodaļa "Vieglas bionoārdīšanās spēja – CO_2 hermētiski noslēgtos traukos (brīvā tilpuma tests)".

(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) Šā pielikuma C.1. nodaļa "Akūtā toksicitāte zivīm".

(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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

(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. ZIVJU AGRĪNO ATTĪSTĪBAS STADIJU TOKSISKUMA TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 210 (2013. gads). Testi, ko veic zivju agrīnās attīstības stadijās, ir paredzēti, lai noteiktu ķimikāliju letālu un subletālu ietekmi uz testētajām stadijām un sugām. Tie sniedz vērtīgu informāciju, kā aplēst ķimikāliju hronisku letālu un subletālu ietekmi uz citām zivju sugām.

2. Testēšanas norādījumu 210 pamatā ir Apvienotās Karalistes priekšlikums, kas tika apspriests ESAO ekspertu sanāksmē Medmenhamā (Apvienotā Karaliste) 1988. gada novembrī un atjaunināts 2013. gadā, lai atspoguļotu pieredzi, kas gūta, izmantojot testēšanu, un ieteikumus no ESAO 2010. gada septembra semināra par zivju toksiskuma testēšanu (1).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

3. Zivis agrīnās attīstības stadijās tiek eksponētas dažādām ūdenī izšķīdinātas testējamās ķimikālijas koncentrācijām. Priekšroka dodama caurplūdes apstākļiem, tomēr, ja tas nav iespējams, pieļaujami arī pusstatiski apstākļi. Sīkākai informācijai jāizmanto ESAO norāžu dokuments par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (2). Testu sāk, apaugļotus ikrus novietojot testa kamerās, un atkarībā no sugas turpina tik ilgi, cik nepieciešams, lai kontroles zivis sasniegtu zivju mazuļu attīstības stadiju. Letālo un subletālo ietekmi novērtē un salīdzina ar kontroles vērtībām, lai noteiktu zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) nolūkā noteikt i) nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) un/vai ii) EC_x (piemēram, EC_{10}, EC_{20}), izmantojot regresijas modeli, ar ko aplēš koncentrāciju, kas izraisītu x % pārmaiņas mērītajā ietekmē. Ziņošana par attiecīgajām ietekmes koncentrācijām un parametriem var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma. EC_x jābūt testējamo koncentrāciju diapazonā, lai EC_x tiktu iegūts no interpolācijas, nevis no ekstrapolācijas (definīcijas sk. 1. papildinājumā).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

4. Testējamā ķimikālija ir tā, kas tiek testēta. Jāzina testējamās ķimikālijas šķīdība ūdenī (sk. šī pielikuma A.6 nodaļu) un tvaika spiediens (sk. šī pielikuma A.4 nodaļu), un jābūt pieejamai tādai ticamai analītiskai metodei ķimikālijas daudzuma kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos, kuras precizitāte un kvantitatīvās noteikšanas robeža ir zināma un norādīta ziņojumā. Lai gan testu veikt nav nepieciešams, akūtā toksiskuma testa rezultāti (sk. šī pielikuma C.1 vai C.49. nodaļu), vēlams tādi, kas veikti ar šim testam izvēlētajām sugām, var sniegt derīgu informāciju.

5. Ja ar šo testēšanas metodi testē maisījumu, pēc iespējas jāraksturo tā sastāvs, piemēram, norādot tā sastāvdaļu ķīmisko identitāti, to kvantitatīvo daudzumu un būtiskās īpašības (kā iepriekš minētās). Pirms testa metodi izmantot maisījuma obligātajai testēšanai, jāapsver, vai tā sniegs paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.

6. Noderīga informācija ir struktūrformula, vielas tīrības pakāpe, šķīdība ūdenī, stabilitāte ūdens un gaismas iedarbībā, pK_a, P_{ow} un tūlītējas bionoārdāmības testa rezultāti (piemēram, šī pielikuma C.4. vai C.29. nodaļa).

▼M7

TESTA PAMATOTĪBA

7. Lai tests būtu pamatots, piemēro šādus nosacījumus:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt > 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

— ūdens temperatūra starp testa kamerām vai starp secīgām dienām testa laikā nevienā brīdī nedrīkst atšķirties vairāk par ± 1,5°C, un tai jābūt temperatūru intervālā, kas norādīts attiecīgajai testa sugai (2. papildinājums);

— testējamā koncentrācija obligāti jāizmēra analītiski;

— apaugļoto ikru kopējai izdzīvotībai un izšķilšanās rezultātam kontrolgrupā un attiecīgā gadījumā šķīdinātāju kontrolgrupā ir jābūt lielākai par 2. papildinājumā norādītajiem robežlielumiem vai vienādai ar tiem.

8. Novērojot minimālas novirzes no pamatotības kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa datu uzticamību, un šie apsvērumi jāatspoguļo ziņojumā. Ziņojumā jāatspoguļo ietekme uz izdzīvotību, izšķilšanos vai augšanu šķīdinātāja kontrolgrupā, tās salīdzinot ar negatīvajiem kontroles datiem, un tā jāapspriež kopsakarā ar testa datu uzticamību.

METODES APRAKSTS

Testa kameras

9. Var izmantot jebkādus stikla, nerūsējoša tērauda vai cita ķīmiski inerta materiāla traukus. Tā kā ir zināms, ka silikonam piemīt augsta lipofīlisko vielu absorbēšanas spēja, iespējami jāvairās izmantot silikona caurulītes caurplūdes pētījumos un silikona blīvējumus, kas ir saskarē ar ūdeni; jāizmanto, piemēram, monobloku stikla akvāriji. Traukiem jābūt pietiekami lieliem, lai tajos varētu notikt pienācīga kontrolēta augšana un tiktu uzturēta izšķīdušā skābekļa koncentrācija (piemēram, mazām zivju sugām pietiktu ar 7 l tvertni), kā arī atbilstība 19. punktā norādītajiem noslogojuma kritērijiem. Testa kameras testa izpildes vietā vēlams izvietot randomizēti. Tāds randomizēti izvietotu bloku plāns, kur katrā blokā ir pārstāvēta katra veida apstrāde, ir vēlamāks par pilnīgi randomizētu izvietojuma plānu. Testa kameras jāaizsargā no nevēlamiem traucējumiem. Testa sistēmai ir vēlams sagatavošanās posms, kurā pirms testa organismu ielaišanas tiek pierādīts, ka testējamās ķimikālijas koncentrācijas ir stabilas ekspozīcijas koncentrācijas.

Sugu izvēle

10. Ieteicamās zivju sugas ir norādītas 1. tabulā. Tas neizslēdz citu sugu izmantošanu, bet tādā gadījumā iespējams, ka testa procedūra jāpielāgo, lai būtu nodrošināti piemēroti testa apstākļi. Tādā gadījumā sugas izvēles pamatojums un eksperimenta metode jāatspoguļo ziņojumā.

Vaislas zivju turēšana

11. Dati par vaislas zivju turēšanu piemērotos apstākļos ir atrodami 3. papildinājumā un minētajās atsaucēs (3),(4),(5).

Rīkošanās ar apaugļotiem ikriem, embrijiem un kāpuriem

12. No sākuma apaugļotus ikrus, embrijus un kāpurus galvenajā traukā var eksponēt mazākos stikla vai nerūsējoša tērauda traukos, kas aprīkoti ar sieta sānu vai galu, darot iespējamu, ka caur tiem plūst testa šķīdums. Neturbulentu plūsmu caur šiem mazajiem traukiem var radīt, tos piekarot

▼M7

turētājam, kas tos kustina augšup un lejup tā, lai organismi visu laiku būtu iegremdēti. Lašu dzimtas zivju apaugļotus ikrus var balstīt uz paliktņiem vai sietiem ar pietiekami lielām atverēm, lai kāpuri pēc izšķilšanās varētu tām izkrist cauri.

13. Ja galvenajā testa traukā ikru turēšanai izmanto ikru konteinerus, paliktņus vai sietus, pēc kāpuru izšķilšanās tie atbilstoši 3. papildinājuma norādēm jāizņem un jāatstāj tikai sieti, kas novērš kāpuru izkļūšanu no traukiem. Ja kāpurus pārvietot nav vajadzības, tos neeksponē gaisam un kāpuru izlaišanai no ikru konteineriem tīklu neizmanto. Šādas pārvietošanas laiks ir atkarīgs no sugas un jādokumentē ziņojumā. Tomēr pārvietošana nav vienmēr nepieciešama.

Ūdens

14. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu (sk. 4. papildinājumu). Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, veidojot kompleksveida savienojumus ar testējamo ķimikāliju) vai negatīvi neietekmē vaislas zivju rādītājus, noteiktos starplaikos jāņem paraugi analīzei. Ja zināms, ka ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad, piemēram, reizi sešos mēnešos būtu jāveic smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), amonjaka, kopējo hlororganisko pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto daļiņu mērījumi. Ja zināms, ka ūdens kvalitāte ir mainīga, mērījumi jāveic biežāk; biežums atkarīgs no kvalitātes mainīguma. Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir norādīti sarakstā 4. papildinājumā.

Testa šķīdumi

15. Lai testa kamerām piegādātu koncentrāciju sēriju, caurplūdes testos ir vajadzīga sistēma, kas nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās ķimikālijas vielas izejšķīdumu (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma). Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums testa laikā jāpārbauda noteiktos starplaikos, un šie testa laikā nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Par piemērotu atzīst caurplūdumu, kas līdzvērtīgs vismaz pieciem testa kameras tilpumiem 24 stundās (3). Tomēr, ja ievēro 19. punktā specificēto noslogojumu, lai barība netiktu ātri aizskalota, ir iespējams izmantot zemāku caurplūdumu, piem., 2–3 testa kameras tilpumi.

16. Izraudzītās koncentrācijas testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams pagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī gluži vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, kratīšana un/vai apstrāde ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas) vai pasīvas dozēšanas metodes (6). Šķīdinātāju par nesējvielu izmantot nav ieteicams. Tomēr, ja jāizmanto šķīdinātājs, paralēli jāveic šķīdinātāja kontrole, izmantojot tādu pašu šķīdinātāja koncentrāciju kā ķīmiskajā apstrādē, t. i., šķīdinātāja līmenim visās koncentrācijās, kā arī šķīdinātāja kontrolgrupā vēlams būt vienādam. Dažām atšķaidīšanas sistēmām tas var

▼M7

būt tehniski grūti izdarāms; tādā gadījumā šķīdinātāja koncentrācijai šķīdinātāja kontrolgrupā jābūt vienādai ar augstāko šķīdinātāja koncentrāciju apstrādes grupā. Grūti testējamām vielām jāizmanto ESAO norāžu dokuments Nr. 23 par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (2). Ja izmanto šķīdinātāju, to izraugās atkarībā no vielas ķīmiskajām īpašībām. ESAO norāžu dokumentā Nr. 23 ir ieteikta maksimālā koncentrācija 100 µl/l. Lai izvairītos no šķīdinātāja iespējamās ietekmes uz mērītajiem beigupunktiem (7), šķīdinātāja koncentrāciju ieteicams saglabāt iespējami zemu.

17. Pusstatiskajā testā var izmantot divas atšķirīgas atjaunošanas procedūras. Vai nu jaunu testa šķīdumu sagatavo tīros traukos un izdzīvojušos ikrus un kāpurus uzmanīgi pārvieto uz jaunajiem traukiem, vai arī testa organismus atstāj testa traukos, nomainot daļu (vismaz divas trešdaļas) testa šķīduma / kontroles tilpuma.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi

Ilgums

18. Testu sāk uzreiz pēc ikru apaugļošanas, un vēlams tos testa šķīdumā iemērkt pirms blastodiska dalīšanās sākuma vai iespējami tuvu šai stadijai. Testa ilgums būs atkarīgs no izmantotās sugas. Daži ieteicamie ilgumi norādīti 2. papildinājumā.

Noslogojums

19. Ar apaugļoto ikru skaitu testa sākumā jāpietiek, lai nodrošinātu atbilstību statistiskā testa nosacījumiem. Tos vienmērīgi izkliedē pa apstrādes grupām, un uz koncentrāciju izmanto vismaz 80 ikrus, ko sadala vienādi pa vismaz četrām replikātu testa kamerām. Noslogojumam (biomasai uz testa šķīduma tilpumu) jābūt pietiekami mazam, lai ikru un kāpuru stadijā, neizmantojot aerāciju, izšķīdušā skābekļa koncentrāciju varētu uzturēt vismaz 60 % apmērā no gaisa piesātinājuma vērtības. Caurplūdes testiem ir ieteikts noslogojums, kas nepārsniedz 0,5 g uz l mitrā svara 24 stundās un nevienā laikā nepārsniedz 5 g uz l šķīduma (3).

Gaisma un temperatūra

20. Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpielāgo testa sugai (sk. 2. papildinājumu).

Barošana

21. Barībai un barošanai ir būtiska nozīme, un ir svarīgi, lai katrā attīstības stadijā no piemērota brīža tiktu piegādāta pareiza barība tādā daudzumā, ar ko pietiek normālai augšanai. Barošanai visos replikātos jābūt aptuveni vienādai, ja vien to nekoriģē atbilstoši mirstībai. Barības pārpalikumi un fēces jāizņem, lai neuzkrātos atkritumi. Detalizēti barošanas režīmi izklāstīti 3. papildinājumā, bet atbilstoši pieredzei barības un barošanas režīmi tiek nepārtraukti atjaunināti, lai paaugstinātu izdzīvotību un optimizētu augšanu. Dzīva barība bagātina vidi, tādēļ to izmanto papildus sausajai vai saldētajai barībai vai tās vietā, ja tas atbilst sugai un attīstības stadijai.

Testēšanas koncentrācijas

22. Parasti nepieciešamas piecas testējamās ķimikālijas koncentrācijas ar vismaz četriem replikātiem katrai koncentrācijai, ko citu no citas šķir konstants koeficients, kurš nepārsniedz 2,2. Izraugoties testējamo koncentrāciju diapazonu, ja pieejama, jāņem vērā informācija par akūto testēšanu, vēlams ar tās pašas sugas zivīm, un/vai par iedarbības diapazona noteikšanas testiem (1). Tomēr, izraugoties testējamās koncentrācijas diapazonu, jāņem vērā visi

▼M7

informācijas avoti, arī tādi avoti kā analoģija un dati par akūto toksiskumu zivju embrijiem. Ja ir jānosaka tikai empīriskās *NOEC*, kā galīgais tests ir pieļaujams robežtests vai paplašinātais robežtests ar mazāk nekā piecām koncentrācijām. Ja testē mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Nav jātestē testējamās ķimikālijas koncentrācijas, kas pārsniedz 96 stundu LC_{50} vai 10 mg/l, izvēloties no abiem mazāko lielumu.

Kontrole

23. Atšķaidīšanas ūdens kontrolei un nepieciešamības gadījumā šķīdinātāja, kas satur šķīdinātāju kā nesējvielu, kontrolei jābūt tikai papildus testējamās ķimikālijas vielas koncentrāciju sērijai (sk. 16. punktu).

Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums

24. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķimikālijas piegādes sistēmas darbība visos replikātos (piemēram, mērot testējamās koncentrācijas). Jānosaka nepieciešamās analītiskās metodes, tostarp attiecīga kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*), un pietiekami jāzina vielas stabilitāte testa sistēmā. Lai raksturotu ekspozīciju, testa laikā testējamās ķimikālijas koncentrācijas nosaka regulāros intervālos. Noteikšanu veic vismaz piecas reizes. Ja izmanto caurplūdes sistēmas, testējamās ķimikālijas analītiskos mērījumus vienā replikātā no katras koncentrācijas veic vismaz reizi nedēļā, replikātus sistemātiski mainot. Papildu analītiskās noteikšanas bieži vien pavērs iespēju uzlabot testa rezultāta kvalitāti. Paraugi var būt jāfiltrē, lai likvidētu daļiņas (piemēram, izmantojot 0,45 μm poru izmēru), vai jācentrifugē, lai nodrošinātu, ka noteikšana ķimikālijai tiek veikta īstā šķīdumā. Lai samazinātu testējamās ķimikālijas adsorbciju, filtri pirms lietošanas ir jāpiesūcina. Ja izmērītās koncentrācijas nav 80–120 % no nominālās koncentrācijas, ir jānosaka ietekmes koncentrācijas un tās jāizsaka salīdzinājumā ar caurplūdes testos izmērīto aritmētisko vidējo koncentrāciju (sk. testa metodes C.20 6. papildinājumu par aritmētiskā vidējā aprēķināšanu (8)), kā arī jāizsaka salīdzinājumā ar pusstatiskajos testos izmērīto koncentrāciju ģeometriskajiem vidējiem (sk. ESAO norāžu dokumenta Nr. 23 par grūti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu 5. nodaļu (2)).

25. Testa laikā vismaz reizi nedēļā visos testa traukos jāmēra izšķīdušais skābeklis, pH un temperatūra, un testa sākumā un beigās — ja tas pamatoti — sāļums un cietība. Vismaz vienā testa traukā vēlams pastāvīgi uzraudzīt temperatūru.

Novērojumi

26. **Embrionālās attīstības stadijas**: embrionālā attīstības stadija brīdī, kad sākas eksponēšana testējamajai ķimikālijai, būtu jāverificē iespējami precīzi. To var izdarīt, izmantojot pienācīgi saglabātu un notīrītu ikru reprezentatīvu paraugu.

27. **Izšķilšanās un izdzīvotība**: novērojumi par izšķilšanos un izdzīvotību jāizdara vismaz reizi dienā, un skaits jāprotokolē. Ja agrīnā embriju attīstības stadijā (t. i., pirmajā vai otrajā testa dienā) uz ikriem novēro pelējumu, skartos ikrus saskaita un izņem. Nedzīvie embriji, kāpuri un zivju mazuļi jāizņem, tiklīdz tie pamanīti, jo tie var strauji sadalīties vai citas zivis tos var sašķaidīt. Nedzīvos īpatņus izņemot, ļoti jāraugās fiziski netraumēt blakus esošos ikrus/kāpurus. Nāves pazīmes atšķiras atkarībā no sugas un attīstības stadijas. Piemēram:

▼M7

— apaugļotiem ikriem: jo īpaši agrīnās stadijās — izteikts gaismas caurlaidības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kā dēļ tie kļūst balti un necaurredzami;

— embrijiem, kāpuriem un zivju mazuļiem: nekustīgums un/vai elpošanas kustību neesība, un/vai sirdsdarbības neesība, un/vai nereaģēšana uz mehānisku kairinājumu.

28. **Anormāls izskats**: anormālas ķermeņa formas kāpuru vai zivju mazuļu skaits jāprotokolē pietiekamos starplaikos atkarībā no testa ilguma un aprakstītās anomālijas. Jāņem vērā, ka anormāli kāpuri un zivju mazuļi ir sastopami dabā un ka dažām sugām to daudzums kontrolgrupā(-ās) var sasniegt vairākus procentus. Ja deformācijas un ar tām saistītā anormālā uzvedība ir uzskatāma par tik smagu, ka tas organismam rada ievērojamas ciešanas, un ir attīstījusies tik tālu, ka organisms neatkopsies, organismu no testa izņem. Šādus dzīvniekus eitanazē un turpmākā datu analīzē uzskata par mirstības gadījumiem. Lielākajai daļai sugu, kuras iesaka izmantot šajā testa metodē (9), (10), (11), (12), ir dokumentēta normāla embrionālā attīstība.

29. **Anormāla izturēšanās**: anomālijas, piemēram, hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, netipisks mierīgums un netipiska barošanās, jāreģistrē atkarībā no testa ilguma pietiekamos starplaikos (piemēram, reizi dienā siltūdeņu sugām). Šādas novērotas ietekmes, lai gan grūti kvantificējamas, var palīdzēt interpretēt mirstības datus.

30. **Svars: Svars**: testa beigās, ņemot par pamatu replikātus, visas izdzīvojušās zivis sver (norādot dzīvnieku skaitu replikātā un vidējo dzīvnieka svaru): priekšroku dod mitrajam svaram (nosusinātiem dzīvniekiem), tomēr var ziņot arī datus par saussvaru (13).

31. **Garums**: testēšanas beigās mēra individuālo garumu. Ieteicams ir kopējais garums, tomēr astes spuras trūdēšanas vai spuru erozijas gadījumā var izmantot standartgarumu. Visām zivīm konkrētajā testā izmanto vienu un to pašu metodi. Indivīda garumu var izmērīt, piemēram, ar bīdmēru, digitālo fotoaparātu vai kalibrētu lēcas mikrometru. Tipiskie minimālie garumi ir definēti 2. papildinājumā.

DATI UN PĀRSKATS

Rezultātu apstrāde

32. Ja ziņojumā jāatspoguļo *NOEC*, ieteicams, lai eksperimenta plāns un izvēlētais statistiskais tests nodrošinātu pietiekamu jaudu (80 % vai vairāk), lai varētu noteikt bioloģiski nozīmīgas izmaiņas beigupunktos. Koncentrāciju ar nozīmīgu ietekmi un parametru ziņošanu var regulēt normatīvie akti. Ja ziņojumā jāatspoguļo EC_x, eksperimenta plānam un izvēlētajam regresijas modelim ir jānodrošina EC_x noteikšana tā, lai (i) ziņojumā atspoguļotais EC_x 95 % ticamības intervālā nebūtu nulle un lai tas nebūtu pārāk liels, (ii) paredzētās vidējās vērtības EC_x 95 % ticamības intervālā nebūtu kontroles vidējā aritmētiskā vērtība; (iii) regresijas modelis nebūtu būtiski neatbilstīgs. Neatkarīgi no tā, kuru no abām pieejām izmanto, ir jāidentificē procentuālās pārmaiņas katram beigupunktam, ko ir svarīgi noteikt vai aplēst.

▼M7

Eksperimenta plāns jāizstrādā tā, lai tas būtu iespējams. Ja iepriekš aprakstītie nosacījumi EC_x noteikšanai nav izpildīti, ir jāizmanto *NOEC* pieeja. Maz ticams, ka visiem beigupunktiem procentuālā pārmaiņa būs vienāda, nav ticams arī, ka izstrādās paveicamu eksperimentu, kurš atbilstu šiem nosacījumiem attiecībā uz visiem beigupunktiem, tāpēc, lai eksperimentu izstrādātu pareizi, galvenā uzmanība ir jāpievērš beigupunktiem, kas ir svarīgi konkrētajam eksperimentam. 5. un 6. papildinājumā attiecībā uz katru pieeju ir pieejamas tādas statistiskās plūsmas diagrammas un norādes, kas palīdz apstrādāt datus un izvēlēties lietošanai vispiemērotāko statistisko testu vai modeli. Var izmantot citas statistiskas pieejas, ja tās ir zinātniski pamatotas.

33. Variācijas būs jāanalizē katras replikātu kopas ietvaros, izmantojot dispersijas analīzi vai kontingences tabulu, un atbilstošās statistisko analīžu metodes jābalsta uz šādu analīzi. Lai individuālas koncentrācijas pa daudziem faktoriem salīdzinātu ar kontroļu rezultātiem, nepārtrauktām atbildreakcijām ir ieteicams descendents Džonkhīra-Terpstra vai Viljamsa tests, bet dihotomām reakcijām, kas atbilst monotonai reakcijai uz koncentrāciju, ja nav pierādījumu par ekstrabinominālo dispersiju (14) — descendents Kohrana-Armitāža tests. Ja ir pierādījumi par ekstrabinominālo dispersiju, ir ieteicama Kohrana-Armitāža testa Rao-Skota modifikācija (15) (16) vai Viljamsa vai Daneta (pēc arcsin-kvadrātsaknes transformācijas), vai Džonkhīra-Terpstra tests, ko piemēro replikātu daļām. Ja dati neatbilst monotonai atbildreakcijai uz koncentrāciju, nepārtrauktām atbildreakcijām var noderēt Daneta, Danna, vai Manna-Vitnija metode, bet dihotomām atbildreakcijām — Fišera precīzais tests (14) (17) (18). Izmantojot jebkuru statistisko metodi vai modeli, ir jārūpējas, lai tiktu izpildīti šīs metodes vai modeļa nosacījumi (piemēram, aplēsta un tad eksperimenta plānā un izvēlētajā testā vai modelī vērā ņemta mainība starp dažādām kamerām). Jānovērtē, vai datiem ir normālsadalījums, un 5. papildinājumā ir izklāstīts, kā rīkoties ar *ANOVA* atlikumiem. 6. papildinājums aplūko papildu apsvērumus regresijas pieejai. Jāapsver, vai neizmantot transformācijas, kas nodrošina atbilstību statistiskā testa nosacījumiem. Tomēr transformācijas, ar ko pielāgo regresijas modeli, ir jāizdara ļoti rūpīgi, jo, piemēram, 25 % pārmaiņa atbildreakcijā pirms datu transformācijas neatbilst 25 % pārmaiņai transformētajā atbildreakcijā. Analīzes vienība un eksperimenta vienība visās analīzēs ir testa kamera, nevis atsevišķas zivis, un tas ir jāatspoguļo gan hipotēžu testos, gan regresijā (3) (14) (19) (20).

Testēšanas pārskats

34. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķimikālija:

Vienas sastāvdaļas viela

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu būtiskas fizikālķīmiskas īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChl* kods, struktūrformula, tīrības pakāpe, attiecīgā gadījumā un cik praktiski iespējams — piemaisījumu ķīmiskā identitāte, utt. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Daudzkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami raksturota, piemēram, norādot sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), kvantitatīvo daudzumu un būtiskas fizikālķīmiskas īpašības.

Testa sugas:

— zinātniskais nosaukums, līnija, izcelsme un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmāka rīcība ar tiem.

▼M7

Testa apstākļi:

— izmantotā testa metode (piemēram, pusstatiskā vai caurplūdes, noslogojums);

— fotoperiods(-i);

— testa plāns (piemēram, testa kameru un replikātu skaits, ikru skaits replikātā, testa kameras materiāls un lielums (augstums, platums, tilpums), ūdens tilpums testa kamerā);

— izejšķīduma pagatavošanas metode un atjaunošanas biežums (ir jānorāda šķīšanu veicinošā viela, ja to lieto, un tās koncentrācija);

— testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piemēram, sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);

— metodes atgūstamības efektivitāte un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un standartnovirzes testa traukos, un metode, ar ko tās iegūtas un pierādījums, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikumu hlora līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās daļiņas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija,

— sīka informācija par barošanu (piemēram, barības veids(-i), avots, dotais daudzums un biežums).

Rezultāti, kas ziņojumā atspoguļoti atsevišķi (vai uz replikātu pamata) un kā vidējais lielums un attiecīgi variācijas koeficienti šādiem beigupunktiem:

— pierādījumi, ka kontrolgrupa atbilst testa sugas vispārējam izdzīvotības pieņemamības standartam (2. papildinājums),

— dati par mirstību katrā stadijā (embriju, kāpuru un zivju mazuļu) un kumulatīvā mirstība;

— dienas līdz izšķilšanās brīdim, katru dienu izšķīlušos kāpuru skaits un izšķilšanās beigas;

— veselu zivju skaits testa beigās;

— dati par izdzīvojušo dzīvnieku garumu (norādīt standartgarumu vai kopējo garumu) un svaru;

— morfoloģisko anomāliju biežums, apraksts un skaits, ja tādas ir,

— ietekmju uz izturēšanos biežums, apraksts un skaits, ja tādas ir,

— statistiskās analīzes pieeja (regresijas analīze vai dispersijas analīze) un datu apstrāde (statistiskais tests vai izmantotais modelis);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);

▼M7

— katrai novērtētajai atbildreakcijai zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) (ar p = 0,05);

— attiecīgā gadījumā katrai novērtētajai atbildreakcijai EC_x un ticamības intervāli (piem., 90 % vai 95 %) un tās aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, devas – atbildreakcijas līknes slīpums, regresijas modeļa formula, lēstie modeļa parametri un to standartkļūda.

Atkāpes no testa metodes.

Rezultātu izvērtējums, tostarp tas, kā testa iznākumu ietekmē jebkādas novirzes no testa metodes.

1. tabula

Testēšanai ieteicamās zivju sugas

SALDŪDENS	UPJU GRĪVU UN JŪRAS ZIVIS
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele	*Cyprinodon variegatus* Karpzobveidīgo zivju suga
Pimephales promelas Melngalvas mailīte	Menidia sp. Saldūdens menīdija
Danio rerio Zebrzivs	
Oryzias latipes Rīsa zivs vai medaka	

LITERATŪRA

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(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 Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (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. and B.R. Jones (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, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Chapter C.20 of this Annex, Daphnia magna Reproduction Test.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of Oryzias latipes (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 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, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

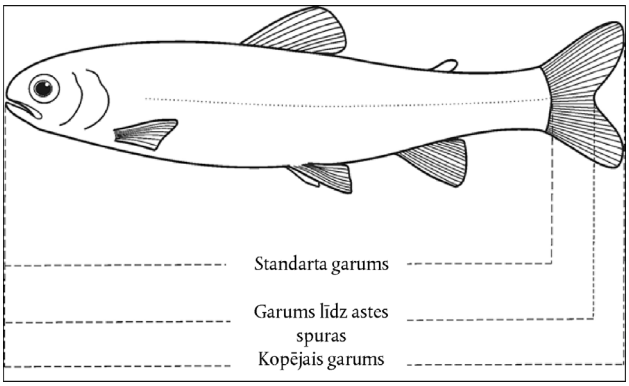
Garums līdz astes spurai: attiecas uz garumu no purna gala līdz astes spuras galam un to izmanto zivīm, kurām grūti noteikt, kur beidzas mugurkauls (www.fishbase.org)

Standartgarums: attiecas uz zivs garumu, kas nomērīts no purna gala līdz pēdējā skriemeļa mugurējam galam vai astes pamatnes sānu viduslīnijas mugurējai daļai. Vienkārši sakot, šajā mērījumā neņem vērā astes spuras garumu. (www.fishbase.org)

Kopējais garums: attiecas uz zivs garumu, kas nomērīts no purna gala līdz astes spuras tālākajam galam, un to parasti mēra, abas puses saspiežot pa viduslīniju. Tas ir taisnas līnijas mērījums, ko nemēra pa ķermeņa izliekuma līniju (www.fishbase.org)

1. attēls

Dažādu garuma lietojumu raksturojums



Ķimikālija: viela vai maisījums.

***EC_x*:** (ietekmes koncentrācija x % ietekmei) ir koncentrācija, kas konkrētajā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontrolgrupu izraisa x % ietekmi uz testa organismiem. Piemēram, ES_{50} ir aplēstā koncentrācija, kas definētajā ekspozīcijas periodā ietekmē testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme (pie $p < 0,05$). Tomēr visām testējamām koncentrācijām, kas pārsniedz *LOEC*, jāuzrāda kaitīga iedarbība, kura ir vienāda vai lielāka par to, kas novērojama pie *LOEC*. Ja šos abus nosacījumus nevar nodrošināt, izsmeļoši jāpaskaidro, kāpēc izraudzīta šāda *LOEC* (un tādējādi *NOEC*). Norādījumi sniegti 5. un 6. papildinājumā.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*) ir testējamā koncentrācija, kura ir tieši zemāka par *LOEC* un kurai noteiktā iedarbības periodā salīdzinājumā ar kontroli nav statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

***UVCB* :** vielas ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiskie materiāli.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

SMILES: Vienkāršotas molekulāro datu ievades lineāras izteiksmes sistēma

▼M7

2. papildinājums

TESTA NOSACĪJUMI, ILGUMS UN IZDZĪVOTĪBAS KRITĒRIJI IETEICAMAJĀM SUGĀM

SUGA	TESTA NOSACĪJUMI			IETEICAMAIS TESTA ILGUMS	Tipiskais minimālais vidējais kopējais kontroles zivju garums pētījuma beigās (mm) (1)	KONTROLGRUPAS IZDZĪVOTĪBA (minimums)	
	Temperatūra (°C)	Sāļums ($^0/_{00}$)	Fotoperiods (stundas)			Izšķilšanās rezultāts	Pēcizšķilšanās rezultāts
Saldūdens:							
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele	10 ± 1.5 (2)		12–16 (3)	2 nedēļas pēc tam, kad kontrolgrupa brīvi barojusies (vai 60 dienas pēc izšķilšanās)	40	75 %.	75 %.
Pimephales promelas Melngalvas mailīte	25 ± 1,5		16	32 dienas no testa sākuma (vai 28 dienas pēc izšķilšanās)	18	70 %.	75 %.
Danio rerio Zebrzivs	26 ± 1,5		12–16 (4)	30 dienas pēc izšķilšanās	11	70 %.	75 %.
Oryzias latipes Rīsa zivs vai medaka	25 ± 2		12–16 (4)	30 dienas pēc izšķilšanās	17	80 %.	80 %.
Upju grīvu un jūras zivis							
Cyprinodon variegatus Karpzobveidīgo zivju suga	25 ± 1,5	15–35 (5)	1216 (4)	32 dienas no testa sākuma (vai 28 dienas pēc izšķilšanās)	17	75 %.	80 %.
Menidia sp. Saldūdens menīdija	22–25	15–35 (5)	13	28 dienas	20	80 %.	60 %.

Apzīmējumi

(1) Tipiskais minimālais vidējais kopējais garums nav derīguma kritērijs, bet attiecībā uz noviržu vērtībām, kas nesasniedz attēlā norādīto vērtību, rūpīgi jāpārbauda testa jutīgums. Minimālo vidējo kopējo garumu atvasina no attiecīgajā brīdī pieejamu datu kopas.

(2) Sakarā ar konkrēto izmantoto varavīksnes foreles līniju var būt nepieciešamas citas temperatūras. Vaislas zivis jātur tādā pašā temperatūrā, kā tās, ko izmanto ikriem. Saņemot ikrus no komerciāla audzētāja, tiem pēc ierašanās ir nepieciešama īslaicīga adaptēšanās (piemēram, 1–2 h) testa temperatūrā.

(3) Kāpuriem līdz vienai nedēļai pēc izšķilšanās tumsa, izņemot pārbaudes brīžus, pēc tam visā testa laikā samazināts apgaismojums (12–16 stundu fotoperiods)(4).

(4) Visos testa apstākļos gaismas režīmam jābūt konstantam.

(5) Visos testos tas jāievēro ± $2^0/_{00}$.

▼M7

3. papildinājums

TESTĒŠANAI IETEICAMĀS ZIVJU SUGAS

SUGA	BARĪBA (*)				PĒCIZŠĶILŠANĀS PĀREJAS LAIKS	LAIKS LĪDZ PIRMAJAI BAROŠANAI
	Vaislas zivis	Tikko izšķīlušies kāpuri	Mazuļi			
			Veids	Biežums		
Saldūdens:						
Oncorhynchus mykiss Varavīksnes forele	foreļu barība	Nepiemēro ([a])	foreļu pirmā barība BSN	2–4 barošanas reizes dienā	14–16 dienas pēc izšķilšanās vai pie uzpeldēšanas (nav būtiski)	19 dienas pēc izšķilšanās vai pie uzpeldēšanas
Pimephales promelas Melngalvas mailīte	BSN, pārslveida barība FBS	BSN	BSN48, pārslveida barība	2–3 reizes dienā	kad izšķilšanās ir 90 %	2 dienas pēc izšķilšanās
Danio rerio Zebrzivs	BSN, pārslveida barība	Tirdzniecībā pieejama kāpuru barība, vienšūņi ([b]), proteīns ([c])	BSN48, pārslveida barība,	BSN vienreiz dienā; pārslveida barība divreiz dienā	kad izšķilšanās ir 90 %	2 dienas pēc izšķilšanās
Oryzias latipes Rīsa zivs vai medaka	pārslveida barība	BSN, pārslveida barība (vai vienšūņi vai virpotāji)	BSN48, pārslveida barība (vai virpotāji)	BSN reizi dienā; pārslveida pārtika divreiz dienā vai pārslveida barība un virpotāji vienreiz dienā	Nav piemērojams	6–7 dienas pēc nārstošanas
Upju grīvu un jūras zivis:						
Cyprinodon varieqatus Karpzobveidīgo zivju suga	BSN, pārslveida barība FBS	BSN	BSN48	2–3 barošanas reizes dienā	Nav piemērojams	1 diena pēc izšķilšanās/ uzpeldēšanas
Menidia sp. Saldūdens menīdija	BSN48, pārslveida barība	BSN	BSN48	2–3 barošanas reizes dienā	Nav piemērojams	1 diena pēc izšķilšanās/ uzpeldēšanas

Apzīmējumi

(*) Barība jādod līdz sāta sajūtai Barības pārpalikumi un fēces jāizņem, lai izvairītos no atkritumu uzkrāšanās

FBS saldētas pieaugušas okeāna garneles, *Artemia sp*

BSN nauplija stadijas okeāna garneles; tikko izšķīlušās

BSN48 nauplija stadijas okeāna garneles; 48 stundas vecas

([a]) kāpuri dzeltenummaisa stadijā nav jābaro

([b]) filtrēts no barotnes

([c]) granulas no fermentēšanas procesa

▼M7

4. papildinājums

DAŽAS PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

Sastāvdaļa	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

▼M7

5. papildinājums

STATISTISKAS NORĀDES *NOEC* NOTEIKŠANAI

Vispārīgi norādījumi

Analīzes vienība ir replikāta tvertne. Tādējādi pastāvīgiem mērījumiem, piemēram, izmēram, aprēķina replikāta vidējo vērtību vai mediānu un analizējamie dati ir šīs replikātu vērtības. Jāpierāda izmantoto testu jauda, vēlams, izmantojot pietiekamus vēsturiskus datus katrai laboratorijai. Attiecībā uz katru beigupunktu kopā ar izmantojamo statistisko testu jānorāda izmēra ietekme, ko iespējams detektēt ar 75–80 % jaudu.

Datubāzēs, kas šīs testa metodes izstrādes laikā pieejamas, ir noteikts, kādu jaudu var iegūt ar ieteicamajām statistiskajām procedūrām. Katrai atsevišķai laboratorijai tās spēja šo prasību attiecībā uz jaudu izpildīt ir jāpierāda, vai nu veicot pašai savu jaudas analīzi, vai pierādot, ka nevienai atbildreakcijai variācijas koeficients (*CV*) nepārsniedz šīs testēšanas vadlīnijas izstrādē izmantoto *CV* 90. procentili. Šie variāciju koeficienti atrodami 1. tabulā. Ja pieejamas tikai replikātu vidējās vērtības vai mediānas, replikāta *CV* var neņemt vērā.

1. tabula

90. procentiles *CV* izvēlētajām saldūdens sugām

Suga	Atbildreakcija	*CV*_starp replikātiem	*CV*_replikātos
Varavīksnes forele	Garums	17,4	9,8
	Svars	10,1	28
Melngalvas mailīte	Garums	16,9	13,5
	Svars	11,7	38,7
Zebrzivs	Garums	43,7	11,7
	Svars	11,9	32,8

Gandrīz visu laboratorisko toksikoloģijas pētījumu vērtēšanai izmantoto statistisko testu uzdevums ir apstrādes grupas salīdzināt ar kontroli. Tāpēc nav pamata sagaidīt nozīmīgu *ANOVA* F-testa rezultātu, pirms nav lietots Daneta vai Viljamsa tests vai nozīmīgu Kruskala-Valisa testa rezultātu, pirms nav lietots Džonkhīra-Terpstra, Manna-Vitnija vai Danna tests (*Hochberg and Tamhane* 1987, *Hsu* 1996, *Dunnett* 1955, 1964, *Williams* 1971, 1972, 1975, 1977, *Robertson et al.* 1988, *Jonckheere* 1954, *Dunn* 1964).

Daneta testā ir iestrādāta kardinalitātes korekcija un, ja par vārtzini izmanto F-testu, tiek negatīvi ietekmēti tā pseidopozitīvie un pseidonegatīvie rezultāti. Līdzīgi, descendentā Viljamsa un Džonkšīra-Terpstra testā, kur katrā solī izmanto būtiskuma līmeni 0,05, saglabājas vispārējs pseidopozitīvu rezultātu līmenis 5 %, un šis līmenis, kā arī testu jauda tiek ietekmēta negatīvi, ja kā vārtzini lieto F-testu vai Kruskala-Valisa testu. Manna-Vitnija un Danna testi ir jākoriģē atbilstoši kardinalitātei, un ieteicams veikt Bonferoni-Holma korekciju.

Lielākā daļa ieteikumu hipotēžu pārbaudei un šo testu pamatā esošo pieņēmumu verifikācijai ir sīki izskatīti OECD materiālā (2006), kas satur arī plašu bibliogrāfiju.

▼M7

Kontroļu apstrāde, ja izmanto šķīdinātāju

Ja izmanto šķīdinātāju, ir jāizmanto gan atšķaidīšanas ūdens kontrole, gan šķīdinātāja kontrole. Abas kontroles jāsalīdzina, vērtējot katru atbildreakciju, un, ja būtiska atšķirība starp kontrolēm netiek konstatēta, tās jākombinē statistiskai analīzei. Pretējā gadījumā *NOEC* noteikšanai vai EC_x aprēķiniem ir jāizmanto šķīdinātāja kontrole, bet ūdens kontrole nav jāizmanto. Sk. validitātes kritēriju ierobežojumu (7. punkts).

Ar T-testu vai Manna–Vitnija testu, izmantojot garumu, svaru, izšķīlušos ikru daļu un kāpuru mirstību vai anormālu kāpuru daļu, kā arī izšķilšanās vai uzpeldēšanas pirmo vai pēdējo dienu (būtiskuma līmenis 0,05) un ignorējot visas apstrādes grupas, salīdzina šķīduma ūdens kontroli un šķīdinātāja kontroli. Šo testu rezultāti jāatspoguļo ziņojumā.

Izmēru mērījumi (garums un svars)

Atsevišķu zivju garuma un svara vērtību sadalījums var būt normāls vai logaritmiski normāls. Gan vienā, gan otrā gadījumā atbilstoši centrālo robežvērtību teorēmai un saskaņā ar datiem no vairāk nekā 100 ELS pētījumiem, kas veltīti trijām saldūdens sugām, replikātu vidējo aritmētisko vērtību sadalījums parasti būs normālsadalījums. Alternatīvi, ja dati vai vēsturiskās datubāzes liecina, ka atsevišķu zivju izmēra sadalījums ir logaritmiski normāls, var aprēķināt atsevišķo zivju vērtību replikātu vidējo logaritmu, un analizējamie dati tad var būt šo replikātu vidējo logaritmu antilogaritmi.

Jānovērtē datu atbilstība normālsadalījumam un dispersijas homogenitātei. Šajā nolūkā ir jāizmanto *ANOVA* modeļa atlikumi ar koncentrāciju kā vienīgo skaidrojošās klases mainīgo. Var veikt vizuālu noteikšanu, izmantojot izkliedes diagrammas un histogrammas vai stumbra-lapu diagrammu. Var izmantot arī formālu testu, piemēram, Šapiro-Vilka vai Andersona-Darlinga testu. Atbilstību dispersijas homogenitātei var novērtēt, vizuāli izpētot to pašu izkliedes diagrammu vai formāli, izmantojot Lēvena testu. Normalitāte un dispersijas homogenitāte ir jānovērtē tikai parametriskiem testiem (piemēram, Viljams, Danets).

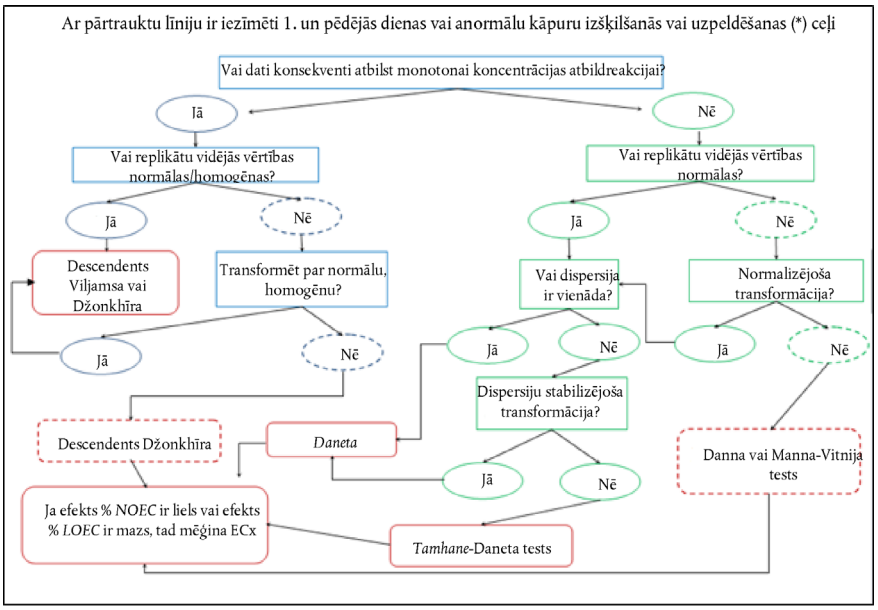
Uzmanība ir jāpievērš iespējamajām izlecošām vērtībām un to ietekmei uz analīzi. Var izmantot *Tukey* izlecošo vērtību pārbaudi un to pašu iepriekš aprakstīto atlikumu diagrammu vizuālu pārbaudi. Jāatceras, ka novērojumi ir par visiem replikātiem, tāpēc izlecošā vērtība no analīzes jāizslēdz tikai pēc rūpīgas apsvēršanas.

Statistiskie testi, kas izmanto eksperimenta plāna un bioloģisko prognožu īpašības, ir descendenti trenda testi, piemēram, Viljamsa un Džonkhīra-Terpstra. Šajos testos pieņem, ka koncentrācija–atbildreakcija ir monotona, un vērtē datu atbilstība šim pieņēmumam. To var izdarīt vizuāli, izmantojot replikātu vidējo aritmētisko vērtību pret testējamo koncentrāciju izkliedes diagrammu. Būs noderīgi šo izkliedes diagrammu salīdzināt ar segmentētu lineāru diagrammu, kurā ir savienotas pēc replikātu paraugu izmēra svērtās koncentrāciju vidējās aritmētiskās vērtības. Ja šī segmentētā lineārā diagramma stipri novirzās no monotonijas, tas var liecināt, ka var būt jāizmanto testi bez trenda. Var izmantot arī formālus testus. Vienkāršs formāls tests ir aprēķināt koncentrācijas vidējo aritmētisko vērtību lineāros un kvadrātiskos kontrastus. Ja kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais kontrasts nav nozīmīgs, tas liecina, ka monotonija, iespējams, ir problemātiska, kas ir papildus jāizvērtē, izmantojot diagrammas. Ja ir jāpārbauda normalitāte vai dispersijas homogenitāte, šos kontrastus var konstruēt, izmantojot datus, kas ir transformēti atbilstoši hierarhijai. Var izmantot alternatīvas procedūras, piemēram, Bartolomjū testu monotonijas noteikšanai, taču tas palielina komplicētību.

▼M7

2. attēls

NOEC izmēru mērījumu diagramma (garums un svars)



(*) Šīs atbildreakcijas nekad neatbilst parametrisko analīžu vai modeļu pieņēmumiem

Ja vien dati atbilst šo testu nosacījumiem, *NOEC* nosaka, descendenti piemērojot Viljamsa vai Džonkhīra-Terpstra testu. OECD (2006) sniedz sīkāku informāciju par šīm procedūrām. Ja dati neatbilst descendenta trenda testa nosacījumiem, var izmantot Daneta testu vai Tamheina-Daneta (T3) testu, katrā no kuriem ir iestrādātas kardinalitātes korekcijas. Šajos testos ir pieņēmums par normālsadalījumu, bet Daneta gadījumā arī par dispersijas homogenitāti. Ja šie nosacījumi nav izpildīti, var izmantot Danna neparametrisko testu. OECD (2006) satur detalizētu informāciju par visiem šiem testiem. 2. attēlā ir sniegts pārskats, kā izvēlēties nepieciešamo testu.

Ikru izšķilšanās un kāpuru izdzīvošana

Dati norāda, kāda daļa ikru individuālajos replikātos izšķīlušies vai kāda daļa kāpuru tajos izdzīvojuši. Šīs daļas ir jāizvērtē attiecībā uz ekstrabinominālo dispersiju, kas šādos mērījumos ir sastopama bieži, tomēr nav universāla. Diagramma 3. attēlā ir norādes testa izvēlei; sīkāku aprakstu sk. tekstā.

Parasti izmanto divus testus. Tie ir Tarones C(α) tests (*Tarone*, 1979) un hī kvadrāta tests, ko katru piemēro atsevišķi katrai testējamajai koncentrācijai. Ja kaut vienā testējamajā koncentrācijā tiek konstatēta ekstrabinominālā dispersija, jāizmanto metodes tās regulēšanai.

1. formula

Tarones C (α) tests (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

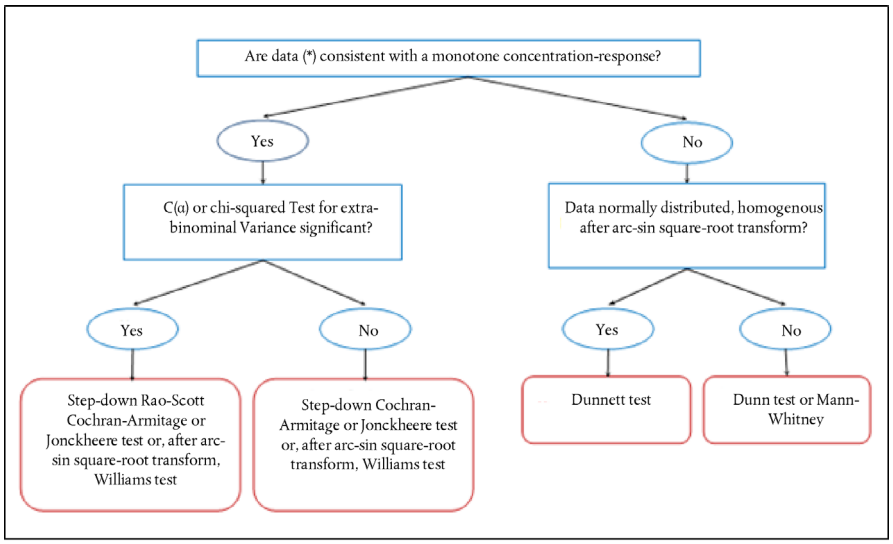
kur p ir proporcijas vidējā aritmētiskā vērtība dotajā koncentrācijā, **m** ir replikātu tvertņu skaits, $\mathbf{n_j}$ ir subjektu skaits replikātā **j**, un $\mathbf{x_j}$ ir reaģējušo, t. i. neizšķīlušos vai mirušo, subjektu skaits replikātā. Šo testu piemēro katrai koncentrācijai atsevišķi. Šo testu var uzskatīt par pielāgotu hī-kvadrāta testu, taču Tarones veiktās

▼M7

ierobežotas jaudas simulācijas parādīja, ka tā jauda ir lielāka nekā hī kvadrāta testam.

3. attēls

NOEC ikru šķilšanās un kāpuru mirstības diagramma.



(*) Data are replicate proportion.

Ja nav būtisku pierādījumu ekstrabinominālai dispersijai, var izmantot Kohrana-Armitāža descendenta testu. Šis tests neņem vērā replikātus, tāpēc, ja eksistē šādi pierādījumi, tiek ieteikta Kohrana-Armitāža testa (*RSCA*) Rao-Skota korekcija, kas ņem vērā replikātus, replikātu izmērus un ekstrabinominālo dispersiju. Alternatīvi testi ir descendenti Viljamsa un Džonkhīra-Terpstra testi un Daneta tests, kas aprakstīts attiecībā uz izmēru mērījumiem. Šie testi ir izmantojami gan gadījumos, kad ir vērojama ekstrabinomiāla mainība, gan gadījumos, kur tādas nav, taču to jauda ir mazliet zemāka (*Agresti* 2002, *Morgan* 1992, *Rao and Scott* 1992, 1999, *Fung et al.* 1994, 1996).

Pirmā vai pēdējā izšķilšanās vai uzpeldēšanas diena

Atbildreakcija ir vesels skaitlis — testa diena, kurā attiecīgajā replikāta tvertnē veikts konkrētais novērojums. Vērtību intervāls parasti ir ļoti ierobežots un bieži liela daļa vērtību ir saistītas, piemēram, visiem kontroles replikātiem un varbūt vienai vai divām zemākajām testējamajām koncentrācijām tiek novērota viena un tā pati izšķilšanās diena. Parametriski testi, piemēram, Viljamsa and Daneta šādiem datiem nav piemēroti. Izņemot gadījumus, kad eksistē pierādījumi par nopietnām monotonijas problēmām, descendents Džonkhīra-Terpstra tests ir ļoti jaudīgs testā izmantotās ķimikālijas efektu noteikšanai. Pretējā gadījumā var izmantot Danna testu.

Kāpuru anomālijas

Atbildreakcija ir kaut kādā veidā anormālu kāpuru skaits. Šī atbildreakcija bieži vien ir reti sastopama un tai ir raksturīgas dažas tās pašas problēmas, kā, piemēram, pirmā izšķilšanās diena, kā arī dažreiz neparasta no koncentrācijas atkarīga atbildreakcija. Ja dati vismaz aptuveni atbilst monotonai koncentrācijai, efektu noteikšanu var jaudīgi izdarīt ar descendento Džonkhīra-Terpstra testu. Pretējā gadījumā var izmantot Danna testu.

▼**M7**

ATSAUCES

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 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., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (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. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and 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 Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

6. papildinājums

STATISTISKAS NORĀDES REGRESIJAS APLĒSĒM

Vispārīgi norādījumi

Modeļu pielāgošanai izmantotie novērojumi ir replikātu vidējās vērtības (garums un svars) vai procentuālais īpatsvars replikātā (ikru izšķilšanās un kāpuru mirstība) (ESAO 2006).

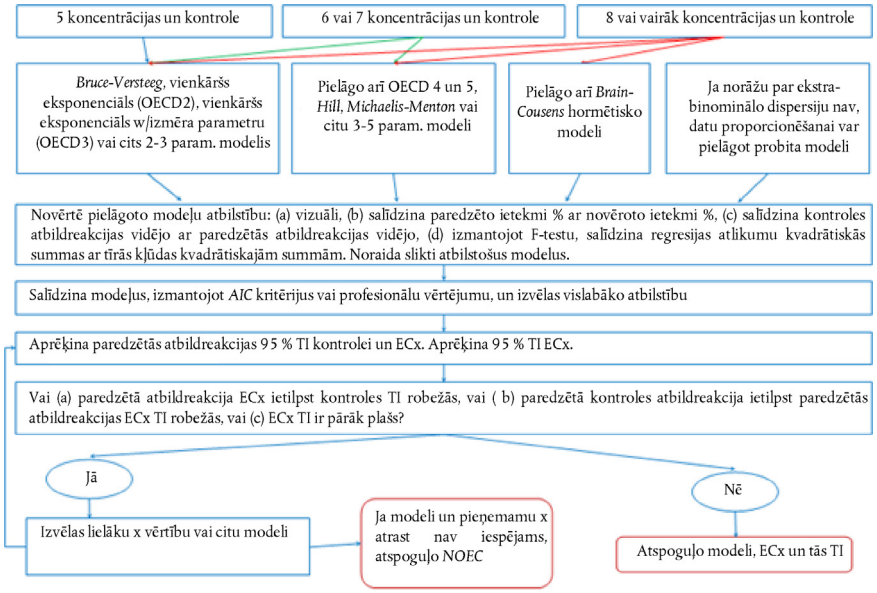
Parasti ir ieteicams izmantot svērto regresiju, par svaru izmantojot replikātu paraugu apjomu. Iespējamas citas svēruma shēmas, piemēram, svērums, kurā izmanto paredzamo reakcijas vidējo aritmētisko vērtību vai tās kombināciju ar replikātu parauga apjomu. Nav ieteicams svēršanai izmantot vienas koncentrācijas paraugu dispersijas apgriezto vērtību (*Bunke et al.* 1999, *Seber and Wild,* 2003, *Motulsky and Christopoulos* 2004, *Huet et al.* 2003).

Ja atbildreakcija pirms analīzes tiek transformēta, ir jāsaglabā novērojumu neatkarība, bet EC_x ar ticamības intervāla robežām ir jāizsaka sākotnējās mērvienības, nevis transformācijas vienībās. Piemēram, garuma logaritma izmaiņa par 20 % neatbilst 20 % garuma izmaiņai (*Lyles et.al* 2008, *Draper and Smith* 1999).

Pārskats par ECx aplēsēm sniegts 4. attēla plūsmas diagrammā. Detaļas ir aprakstītas turpmāk tekstā.

4. attēls

Diagramma replikāta vidējā garuma, svara, izšķīlušos ikru, vai kāpuru mirstības EC_x aplēsei, sīkāku informāciju sk. tekstā.



Apsvērumi attiecībā uz ikru šķilšanos un kāpuru mirstību

Vērtējot ikru šķilšanos un kāpuru mirstību, parasti var izmantot samazināšanās modeli, ja vien netiek pielāgots turpmāk aprakstītais varbūtības modelis. T. i., jāmodelē neizšķīlušos ikru vai nobeigušos kāpuru procentuālais īpatsvars. Tas ir tāpēc, ka EC_x raksturo tādu koncentrāciju, kurā notiek pārmaiņas, kas atbilst x % no kontroles vidējās aritmētiskās atbildreakcijas. Ja kontrolgrupā neizšķiļas 5 % ikru un tiek modelēta neizšķilšanās, tad EC_{20} attiecas uz koncentrāciju, kurā notiek pārmaiņas, kas atbilst 20 % no kontrolgrupas ar piecprocentīgu neizšķilšanos; šajā gadījumā tā ir pārmaiņa 0,2*0,05 = 0,01, jeb 1 procentpunkts salīdzinājumā ar neizšķilšanos 6 %. Ar pieejamajiem datiem tik nelielu pārmaiņu

▼M7

jēgpilnā veidā aprēķināt nav iespējams, un tā nav bioloģiski nozīmīga. Savukārt, modelējot izšķīlušos ikru procentuālo īpatsvaru, kontrolgrupas procentuālais īpatsvars šajā piemērā būtu 95 %, tātad 20 % samazinājums salīdzinājumā ar kontroli atbilstu pārmaiņai 0,95*0,2 = 0,18, proti, izšķilšanās samazinājums no 95 % līdz 77 % (= 95–18), tādējādi iedarbību izraisošā koncentrācija ir aplēšama un, iespējams, interesē vairāk. Šī problēma parasti neietekmē izmēru mērīšanu, lai gan nevēlama ietekme uz izmēru parasti nozīmē izmēra samazināšanos.

Izmēru modeļi (garums vai svars) un ikru šķilšanās vai kāpuru izdzīvotība

Izņemot Braina-Kūzena hormētisko modeli, visi šie modeļi ir ESAO aprakstīti un ieteikti (2006). Tā dēvētie ESAO 2–5 ekotoksiskuma eksperimentos ir aprakstīti arī *Slob* (2002). Protams, ka noderīgi var būt arī daudzi citi modeļi. *Bunke, et al*. (1999) norāda vairākus šeit neiekļautus modeļus, un ir daudz atsauču uz citiem modeļiem. Turpmāk norādītie tiek ieteikti kā īpaši piemēroti ekotoksiskuma eksperimentiem un tos plaši izmanto.

5 testējamās koncentrācijas un kontrole

— Bruce-Versteeg

— Vienkāršs eksponenciāls (ESAO 2)

— Eksponenciāls ar formas parametru (ESAO 3)

— Vienkāršs eksponenciāls ar zemāko robežu (ESAO 4)

6 vai vairāk testējamās koncentrācijas un kontrole

— Eksponenciāls ar formas parametru un zemāko robežu (ESAO 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Ja ir vizuālas liecības par hormēzi (maz ticams, ja izmanto ikru izšķilšanos vai kāpuru mirstību, bet dažreiz novērota izmēru novērojumos)

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Alternatīvi modeļi, ikru neizšķilšanās un kāpuru mirstība

— Ja nav pierādījumu par ekstrabinominālo mainību un modeļa pielāgošanā tiek aplēsta kontroles incidence, minēto atbildreakciju pieaugošos modeļus var pielāgot, izmantojot probita (vai logistiskus) modeļus. Tā nav piemērotākā metode, jo par analīzes vienību izmanto individuālu rezultātu, nevis replikātu (*Morgan* 1992, *O'Hara Hines and Lawless* 1993, *Collett* 2002, 2003).

Viena modeļa atbilstība

— Vizuāli salīdziniet katrai testējamajai koncentrācijai novēroto un paredzēto procentuālo samazinājumu (*Motulsky and Christopoulos* 2004, *Draper and Smith* 1999).

— Izmantojot F-testu, regresijas kļūdas vidējā kvadrātu salīdziniet ar tīrās kļūdas vidējā kvadrātu (*Draper and Smith* 1999).

— Pārliecinieties, ka visi modeļa nosacījumi ir būtiski lielāki par nulli (t. i., nosakiet, vai visi modeļa nosacījumi ir svarīgi) (*Motulsky and Christopoulos* 2004).

▼M7

— Regresijas atlikumu pret testējamo koncentrāciju iespējams atlikt log(konc.) skalā. Šis izkārtojums nedrīkst būt sistemātisks; punktiem ir jābūt randomizēti izkliedētiem gar horizontālo līniju nulles augstumā.

— Datu normalitāte un dispersijas viendabība ir jānovērtē tādā pašā veidā, kā minēts 5. papildinājumā

— Papildus tam ir jānovērtē regresijas modeļa atlikumu normalitāte, izmantojot tās pašas metodes, kas ir norādītas 5. papildinājumā *ANOVA* atlikumiem

Modeļu salīdzināšana

— Izmanto Akiake *AICc* kritērijus. Mazākas *AICc* vērtības liecina par labāku atbilstību un, ja *AICc(B)-AICc(A)* $\geq$ 10, A modelis ir gandrīz noteikti labāks, nekā B modelis (*Motulsky and Christopoulos* (2004).

— Salīdziniet abus modeļus vizuāli, pārbaudot, cik labi tie atbilst iepriekš minētajiem viena modeļa kritērijiem.

— Ir ieteicams pielietot taupības principu, proti, izmantot visvienkāršāko modeli, kas pietiekami atbilst datiem (*Ratkowsky* 1993, *Lyles* et.al 2008).

***EC_x* aplēses kvalitāte**

EC_x ticamības intervāls (CI) nedrīkst būt pārāk liels. Lai lemtu, cik liels var būt ticamības intervāls, lai EC_x vēl būtu izmantojams, jāspriež statistiski. Ikru šķilšanās un izmēru datiem pielāgotu regresijas modeļu simulāciju dati rāda, ka EC_x (x = 10, 20 vai 30) ar ticamības intervālu apmēram 75 % neaptver vairāk kā divas testējamās koncentrācijas. Tāds ir vispārīgs norādījums par pieņemamību, kā arī praktisks norādījums par to, kāds rezultāts ir sasniedzams. Daudzi autori apgalvo, ka ziņojumā jāatspoguļo visu modeļa parametru ticamības intervāli, un ka lieli parametru ticamības intervāli liecina par modeļu nepieņemamību (*Ott and Longnecker* 2008, *Alvord and Rossio* 1993, *Motulsky and Christopoulos* 2004, *Lyles et al.* 2008, *Seber and Wild* 2003, *Bunke et al*. 1999, *Environment Canada* 2005).

EC_x ticamības intervāls (vai jebkurš cits modeļa parametrs) nedrīkst būt nulle (*Motulsky and Christopoulos* 2004). Šī regresija atbilst minimālajai būtiskajai starpībai, kas bieži tiek minētas hipotēžu pārbaudes pieejās (piemēram, *Wang et al* 2000). Tas atbilst arī gadījumam, kur *LOEC* atbildreakciju vidējo aritmētisko vērtību ticamības intervālā nav kontroles vidējās vērtības. Jāapsver, vai parametra aplēses ir zinātniski iespējamas. Piemēram, ja y0 ticamības intervāls ir ±20 %, nav ticama neviena EC_{10} aplēse. Ja modelis koncentrācijā C paredz 20 % ietekmi un C un zemākās koncentrācijas maksimālā novērotā ietekme ir 10 %, tad EC_{20} nav ticama (*Motulsky and Christopoulos* 2004, Wang *et al.* 2000, *Environment Canada* 2005).

Lai iegūtu EC_x, vajadzētu iztikt bez ekstrapolācijas ārpus pozitīvo koncentrāciju intervāla (*Draper and Smith* 1999, *OECD* 2006). Piemēram, vispārīgos norādījumos var noteikt, ka EC_x nedrīkst būt vairāk kā par 25 % zemāka par zemāko testēto koncentrāciju vai par 25 % pārsniegt augstāko testēto koncentrāciju.

ATSAUCES

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and 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. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (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. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ĪSAIS ZIVJU VAIROŠANĀS TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas vadlīnijai 229 (2012). Nepieciešamība izstrādāt un validēt zivju testu, ar kuru nosaka endokrīni aktīvas ķimikālijas, izriet no apsvērumiem, ka ķimikāliju līmeņi vidē, šīm ķimikālijām mijiedarbojoties ar cilvēku un savvaļas dzīvnieku endokrīno sistēmu, var šo sistēmu negatīvi ietekmēt. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu un izstrādātu jaunus. Viens no rīcības elementiem bija izstrādāt testēšanas norādījumus, kā noteikt ķimikālijas ar aktīvu iedarbību uz zivju sugu endokrīno sistēmu. Zivju vairošanās īsais tests tika pārbaudīts visaptverošā validācijas programmā, kurā īstenoja starplaboratoriju salīdzinošos pētījumus ar attiecīgām ķimikālijām, lai pierādītu, ka tests, kurā detektē ķimikālijas, kas ietekmē zivju vairošanos ar dažādu mehānismu, tostarp endokrīnās sistēmas mehānismu, starpniecību, ir atbilstīgs un ticams. Visi ESAO testēšanas norādījumu beigupunkti ir validēti melngalvas mailītēm, un daļa beigupunktu ir validēti Japānas medakai (t. i., vitelogenīns un sekundārās dzimumpazīmes) un zebrzivij (t. i., vitelogenīns). Validācijas darbu ir zinātniski recenzējusi gan ekspertu grupa, kurus izraudzījušies ESAO Testēšanas vadlīnijas programmas (6) izstrādes nacionālie koordinatori, gan neatkarīgu ekspertu grupa, kurus šim darbam norīkojusi Amerikas Savienoto Valstu Vides aizsardzības aģentūra (29). Tests nav izstrādāts tā, lai ar to noteiktu hormonālo traucējumu specifiskos mehānismus, jo testa dzīvniekiem nav skarta hipotalāma-hipofīzes-gonādu (HPG) ass, tāpēc reaģēšana uz ķimikālijām, kas iedarbojas uz hipotalāma-hipofīzes-gonādu asi, var notikt dažādos līmeņos.

2. Šī testēšanas metode apraksta *in vivo* skrīninga testu, kurā dzimumgatavību sasniegušus zivju tēviņus un nārstojošas mātītes tur kopā un ierobežotā dzīves cikla daļā (21 diena) eksponē kādai ķimikālijai. Pēc 21 dienas ekspozīcijas perioda mātītēm un tēviņiem mēra divus biomarķieru beigupunktus, kas ir testējamās ķimikālijas endokrīnās iedarbības vai androgēniskās iedarbības rādītāji; šie beigupunkti ir vitelogenīns un sekundārās dzimumpazīmes. Vitelogenīnu mēra melngalvas mailītei, Japānas medakai un zebrzivij, savukārt sekundārās dzimumpazīmes mēra melngalvas mailītei un Japānas medakai. Turklāt katru dienu visa testa laikā uzrauga kvantitatīvo auglību. Gonādas saglabā un histopataloģiju var novērtēt arī, lai izvērtētu testa dzīvnieku reproduktīvo veselību un pastiprinātu citu beigupunktu rezultātu svarīgumu.

3. Biotestu izmanto kā vairošanās *in vivo* skrīninga testu, un tā izmantošana jāskata kopā ar "*OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*" (30). Šajā konceptuālajā pamatdokumentā zivju vairošanās īsais tests ir ieteikts 3. līmenī kā *in vivo* tests, kas sniedz datus par izvēlēto(-ajiem) endokrīno (-ajiem) mehānismu(-iem)/ceļu(-iem).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

4. Vitelogenīns (VTG) parasti veidojas oldējēju mugurkaulnieku mātīšu aknās atbildreakcijā uz organismā cirkulējošo endogēno estrogēnu. Tas ir olas dzeltenuma proteīnu prekursors, kas izstrādājas aknās un pa asinsrites sistēmu nonāk olnīcās, kur to uzņem un modificē attīstošās olšūnas. Nenobriedušu zivju mātīšu un tēviņu plazmā vitelogenīns gandrīz nav detektējams, jo organismā pietiekamā daudzumā nav cirkulējoša estrogēna, tomēr aknas vitelogenīnu spēj sintezēt un izdalīt, reaģējot uz eksogēnu estrogēnisku stimulāciju.

▼M7

5. Vitelogenīna mērījumus izmanto, lai detektētu ķimikālijas ar dažādiem estrogēniskās iedarbības veidiem. Estrogēniskas iedarbības ķimikālijas var detektēt, mērot zivju tēviņu organismā inducējušos vitelogenīnu, un tas plaši dokumentēts zinātniski recenzētos izdevumos (piemēram, (7)). Vitelogenīna inducēšanās novērota arī pēc eksponēšanas aromatizējamiem androgēniem (8, 9). Zivju mātīšu organismā cirkulējošā estrogēna līmeņa pazemināšanās, piemēram, inhibējot aromatāzi, kas endogēno androgēnu pārvērš dabiskā estrogēnā 17β-estradiolā, samazina VTG līmeni, un pēc tā var noteikt aromatāzi inhibējošas ķimikālijas (10, 11). Bioloģiskā nozīme, kas piemīt vitelogenīna atbildreakcijai uz estrogēnu vai aromatāzes inhibēšanu, ir pierādīta un plaši dokumentēta. Tomēr VTG izstrādāšanos zivju mātīšu organismā var ietekmēt vispārējais toksiskums un neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksiskums.

6. Sekmīgi izstrādātas un standartizētas ir vairākas plaši izmantojamas mērīšanas metodes. Viens no piemēriem ir katrai sugai specifiskas imūnfermentatīvās analīzes (*ELISA*) metodes, kurās no atsevišķām zivīm ņemtos nelielos asins vai aknu paraugos imūnķīmiskā analīzē kvantitatīvi novērtē VTG izstrādāšanos (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). VTG mērījumiem izmanto melngalvas mailītes asinis, zebrzivs asinis vai galvas/astes homogenātu un Japānas medakas aknas. Japānas medakai konstatēta laba korelācija starp VTG mērījumiem asinīs un aknās (19). 6. papildinājumā sniegta ieteicamā paraugu ņemšanas kārtība VTG analīzei. Komplekti VTG mērījumu veikšanai ir plaši pieejami; šo komplektu pamatā jābūt validētai katrai sugai specifiskai *ELISA* metodei.

7. Atsevišķu zivju sugu tēviņu sekundārās dzimumpazīmes ir ārēji redzamas, kvantitatīvi novērtējamas un jutīgas pret organismā cirkulējošo endogēno androgēnu līmeni; tas attiecas uz melngalvas mailīti un Japānas medaku, taču neattiecas uz zebrzivi, kam kvantitatīvi novērtējamas sekundārās dzimumpazīmes nav novērojamas. Mātītēm, kas eksponētas ūdenī esošām androgēniskām ķimikālijām, var attīstīties tēviņu sekundārās dzimumpazīmes. Zinātniskajā literatūrā ir vairāki pētījumi, kuros attiecībā uz melngalvas mailīti (20) un Japānas medaku (21) dokumentēta šāda reakcija. Interpretējot tēviņu sekundāro dzimumpazīmju izpausmju samazināšanos, sakarā ar zemo statistisko ticamību jāsaglabā piesardzība, un jāņem vērā ekspertu viedoklis un pierādījumu svars. Zebrzivs izmantošana šajā testā ir ierobežota sakarā ar to, ka tai nav kvantitatīvi novērtējamu sekundāro dzimumpazīmju, kas reaģētu uz androgēniskas iedarbības ķimikālijām.

8. Galvenais rādītājs, kas liecina par melngalvas mailītes eksponēšanu eksogēnam androgēnam, ir kārpiņu skaits uz zivju mātītes purna. Japānas medakai galvenais rādītājs, kas liecina par eksogēnu eksponēšanu androgēniskām ķimikālijām, ir kārpiņveida izaugumu skaits zivju mātītēm. 5A papildinājumā un 5A papildinājumā norādītas procedūras, saskaņā ar kurām ieteicams izvērtēt attiecīgi melngalvas mailītes un Japānas medakas dzimumpazīmes.

9. Zivju 21 dienas tests ietver kvantitatīvu ikru veidošanās novērtējumu un gonādu saglabāšanu neobligātai histopatoloģiskai izpētei. Dažas pārvaldes iestādes var pieprasīt šo papildu beigupunktu, lai pilnīgāk izvērtētu testa dzīvnieku reproduktīvo veselību, vai gadījumos, kur vitelogenīna un sekundāro dzimumpazīmju raksturojums neatbilst ķīmiskajai ekspozīcijai. Lai gan daži beigupunkti var būt stipri diagnosticējoši (piemēram, VTG inducēšanās tēviņiem un kārpiņu veidošanās mātītēm), ne visi beigupunkti (piemēram, auglība un gonādu histopataloģija) testā paredzēti, lai viennozīmīgi identificētu specifiskus šūnu darbības mehānismus. Drīzāk beigupunktu komplekts,

▼M7

kopumā ņemot, ļauj izdarīt pieņēmumus attiecībā uz iespējamiem endokrīniem traucējumiem un tādējādi sniegt norādes turpmākai testēšanai. Lai gan auglība tieši neattiecas uz endokrīno sistēmu, ņemot vērā tās jutību uz zināmajām endokrīni aktīvajām ķimikālijām (5), tā ir svarīgs iekļaujams beigupunkts, jo ja tā un citi beigupunkti netiek ietekmēti, ir skaidrs, ka savienojums visticamāk nav endokrīni aktīvs. Tomēr, ja auglība ir ietekmēta, tas nopietni ietekmēs pierādījumu svara izvedumus. Norādes par datu interpretēšanu un testa rezultātu pieņemšanu sniegtas turpmāk šīs testa metodes aprakstā.

10. Šajā testa metodē minētās definīcijas ir minētas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

11. Testēšanas laikā reproduktīvā attīstības posmā esošus zivju tēviņus un mātītes kopā eksponē testēšanas traukos. Tā kā dzīvnieki ir pieauguši un reproduktīvā attīstības posmā, iespējams skaidri atšķirt dzimumus un visus beigupunktus analizēt dzimuma griezumā, un tas arī garantē jutību pret eksogēnām ķimikālijām. Dzimumu apstiprina testa nobeigumā makroskopiskā gonādu izmeklēšanā, kurā ar šķērēm atver vēdera apvidu. Pārskats par būtiskajiem biotesta nosacījumiem sniegts 2. papildinājumā. Testu parasti veic ar zivīm no nārstojošas populācijas; neizmanto dzīvniekus no novecojošām populācijām. Norādījumi par zivju vecumu un reproduktīvo statusu sniegti iedaļā par zivju izraudzīšanos. Testu veic ar trim ķīmiskās ekspozīcijas koncentrācijām, un, ja nepieciešams, nodrošina ūdens un šķīdinātāja kontrolgrupas. Katrā zebrzivs apstrādē izmanto divus traukus jeb replikātus (katrā traukā 5 tēviņi un 5 mātītes). Katrā melngalvas mailītes apstrādē izmanto četrus traukus jeb replikātus (katrā traukā 2 tēviņi un 4 mātītes). Tas nepieciešams, lai pielāgotos melngalvas mailītes tēviņu teritoriālajai uzvedībai, vienlaikus saglabājot pietiekamu testa jaudu. Katrā medakas apstrādē izmanto četrus traukus jeb replikātus (katrā traukā 3 tēviņi un 3 mātītes). Ekspozīcijas ilgums ir 21 diena, un zivju paraugus ņem ekspozīcijas 21. dienā. Kvantitatīvo auglību uzrauga katru dienu.

12. Ņemot paraugus 21. dienā, visus dzīvniekus humāni nonāvē. Melngalvas mailītei un Japānas medakai mēra sekundārās dzimumpazīmes (sk. 5.A papildinājumu un 5.B papildinājumu); VTG noteikšanai zebrzivs un melngalvas mailītes organismā ievāc asins paraugus, lai gan VTG zebrzivs organismā var noteikt arī ar galvas/astes paraugiem (6. papildinājums); Japānas medakas VTG analīzē izmanto aknu paraugus (6. papildinājums); potenciālai histopatoloģiskai izvērtēšanai ar fiksatoru apstrādā vai nu veselas vai preparētas gonādas (22).

TESTA PIEŅEMAMĪBAS KRITĒRIJI

13. Lai testa rezultāti būtu pieņemami, jāizpilda šādi kritēriji:

— ekspozīcijas perioda beigās mirstība ūdens (vai šķīdinātāja) kontrolgrupā nepārsniedz 10 procentus;

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā ekspozīcijas periodā jābūt vismaz 60 procentiem no gaisa piesātinājuma vērtības;

— ūdens temperatūras atšķirība starp testēšanas tvertnēm nevienā ekspozīcijas perioda brīdī nepārsniedz ± 1,5 °C, un testa sugām norādītajos temperatūras diapazonos (2. papildinājums) to uztur 2°C svārstību diapazonā;

— ir pieejami dati, kas liecina, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir uzturēta vidējo izmērīto vērtību diapazonā ± 20 %;

▼M7

— ir pieejami dati, ka visos replikātos pirms to ekspozīcijas ķimikālijai un kontroles replikātos testa laikā zivis aktīvi nārsto.

METODES APRAKSTS

Aparatūra

14. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a. skābekļa un pH mērīšanas iekārtas;

b. aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;

c. attiecīgs aprīkojums temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktai uzraudzībai;

d. ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un apdzīvotības blīvumu (sk. 2. papildinājumu);

e. melngalvas mailītes un zebrzivs nārsta substrāts, nepieciešamā informācija sniegta 4. papildinājumā;

f. pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti ± 0,5 mg).

Ūdens

15. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugas uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un augšanu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanas ūdens pārāk neietekmē testa rezultātu (piemēram, kompleksējoties ar testējamo ķimikāliju), paraugus tā analīzei ņem ar noteiktiem starplaikiem. Smago metālu (piemēram, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd un Ni), galveno anjonu un katjonu (piemēram, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, un SO_4^{2-}), pesticīdu (piemēram, kopējo fosfororganisko pesticīdu un kopējo hlororganisko pesticīdu), kopējā organiskā oglekļa un suspendētu cietu vielu mērījumi, piemēram, jāizdara reizi trijos mēnešos, ja ir zināms, ka atšķaidīšanas ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga. Ja ir pierādīts, ka vismaz viena gada laikā ūdens kvalitāte ir nemainīga, noteikšanu var veikt retāk un starplaiki var būt garāki (piemēram, reizi sešos mēnešos). Daži pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskie parametri ir norādīti 3. papildinājumā.

Testa šķīdumi

16. Izraudzītās koncentrācijas testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams pagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, kratīšana vai apstrāde ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas (šķīdības kolonnas). Nav ieteicams par nesējvielu izmantot šķīdinātāju. Tomēr, ja šķīdinātājs ir nepieciešams, vienlaikus nodrošina šķīdinātāja kontrolgrupu, kurai šķīdinātāja koncentrācija ir tāda pati kā grupām, ko apstrādā ar ķimikāliju. Grūti testējamām ķimikālijām tehniski labākais risinājums var būt šķīdinātājs; sk. ESAO norādījumu dokumentu par ūdenstoksiskuma testēšanu grūti testējamām vielām un maisījumiem (23). Šķīdinātāju izraugās atkarībā no vielas vai maisījuma ķīmiskajām īpašībām. Jāievēro ESAO norādījumu dokumentā ieteiktā maksimālā koncentrācija 100 µl/l. Tomēr nesen publicētā pārskatā (24) pausti papildu apsvērumi attiecībā uz šķīdinātāju izmantošanu endokrīnās sistēmas darbības testēšanā. Tāpēc, ja nepieciešams, tehniski pamatotās situācijās šķīdinātāja koncentrāciju samazina līdz minimumam (atkarībā no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām).

▼M7

17. Testēšanā izmanto caurplūdes sistēmu. Šāda sistēma (piemēram, dozējošais sūknis, proporcionālas atšķaidīšanas ierīce, piesātinātāja sistēma) nepārtraukti piegādā un atšķaida testējamās ķimikālijas izejšķīdumu, lai testēšanas tvertnēs nodrošinātu nemainīgu koncentrāciju. Izejšķīdumu un atšķaidīšanas ūdens caurplūdums testa laikā jāpārbauda noteiktos intervālos, vēlams, katru dienu, un testa laikā tas nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Jāraugās, lai neizmantotu nekvalitatīvas plastmasas caurules vai citus materiālus, kas satur bioloģiski aktīvas ķimikālijas. Izraugoties caurplūdes sistēmas materiālu, jāņem vērā testējamās ķimikālijas iespējama adsorbcija uz šā materiāla.

Zivju turēšana

18. Testa zivis izvēlas no laboratorijas populācijas, vēlams, no viena bara, kas vismaz divas nedēļas pirms testa ir aklimatizējies tādos pašos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos kā testa apstākļi. Svarīgi, lai noslogojums un apdzīvotības blīvums (definīcijas sk. 1. papildinājumā) būtu izmantotajai testa sugai piemēroti (sk. 2. papildinājumu).

19. Pēc 48 stundu sākumposma reģistrē mirstību un piemēro šādus kritērijus:

— mirstība septiņās dienās pārsniedz 10 % no populācijas: grupu tālākai testēšanai neizmanto;

— mirstība ir no 5 % līdz 10 % no populācijas: grupu aklimatizē vēl septiņas dienas; ja mirstība otru septiņu dienu laikā pārsniedz 5 %, grupu tālākai testēšanai neizmanto;

— mirstība septiņās dienās ir mazāka par 5 % no populācijas: grupu pieņem.

20. Aklimatizācijas laikā, pirmsekspozīcijas un ekspozīcijas periodā zivis nedrīkst medikamentozi ārstēt.

Pirmsekspozīcijas periods un zivju izraudzīšanās

21. Ieteicams vienas līdz divu nedēļu pirmsekspozīcijas periods, kurā zivis tādos pašos traukos kā testēšanas trauki. Zivis visā turēšanas laikā un ekspozīcijas fāzē baro *ad libitum*. Ekspozīcijas fāzi sāk ar aktīvi nārstojošām pieaugušām zivīm, kurām ir skaidri izteiktas dzimumatšķirības un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem (piemēram, ja testē melngalvas mailīti un medaku – ar skaidri redzamām sekundārajām dzimumpazīmēm). Tikai vispārīgu norādījumu līmenī (šos norādījumus nedrīkst izvērtēt atrauti no attiecīgās zivju grupas faktiskā reproduktīvā statusa) melngalvas mailītēm jābūt aptuveni 20 (±2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 25±2 °C temperatūrā. Japānas medakām jābūt aptuveni 16 (±2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 25±2 °C temperatūrā. Zebrzivīm jābūt aptuveni 16 (±2) nedēļas vecām, pieņemot, ka tās visā dzīves ciklā audzētas 26±2 °C temperatūrā. Ikru nēršana pirmsekspozīcijas posmā jānovērtē katru dienu. Ieteicams, lai pirms testa ekspozīcijas posma visās replikātu tvertnēs būtu novērojama nārstošana. Šajā posmā kvantitatīvas norādes par vēlamo ikru ražošanu dienā nav iespējamas, bet relatīvi parasti novēro, ka katrai sugai vidējais iznērstais daudzums ir > 10 ikri uz vienu mātīti dienā. Sadalot replikātus dažādajiem eksperimenta līmeņiem, jāizmanto attiecībā pret ikru ražošanas rezultātiem randomizēti izvietotu bloku plāns, lai būtu nodrošināts sabalansēts replikātu sadalījums.

▼M7

TESTĒŠANAS PLĀNS

22. Izmanto trīs testējamās ķimikālijas koncentrācijas, vienu kontrolgrupu (ūdens) un, ja nepieciešams, vienu šķīdinātāja kontrolgrupu. Šos datus var analizēt, lai noteiktu, vai starp apstrādes grupu un kontrolgrupu rezultātiem ir vērojamas statistiski būtiskas atšķirības. Šo analīžu mērķis nav tās izmantot riska novērtēšanā (25), bet gan gūt informāciju par to, vai jāturpina testēt ķimikālijas kaitīgā ietekme (t. i., attiecībā uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un vairošanos).

23. Attiecībā uz zebrzivi eksperimenta 21. dienā no katra apstrādes līmeņa un no kontrolgrupas(-ām) paraugam ņem tēviņus un mātītes (5 tēviņus un 5 mātītes no katra no abiem replikātiem), kam mēra vitelogenīnu. Attiecībā uz medaku eksperimenta 21. dienā no katra apstrādes līmeņa un no kontrolgrupas(-ām) paraugam ņem tēviņus un mātītes (3 tēviņus un 3 mātītes no katra no četriem replikātiem), kam mēra vitelogenīnu un sekundārās dzimumpazīmes. Attiecībā uz melngalvas mailīti ekspozīcijas 21. dienā paraugam ņem tēviņus un mātītes (2 tēviņus un 4 mātītes no katra no četriem replikātiem), arī no kontrolgrupas(-ām), un tiem mēra vitelogenīnu un sekundārās dzimumpazīmes. Kvantitatīvi novērtē auglību, un potenciālai histopatoloģiskai izvērtēšanai ar fiksatoru apstrādā vai nu veselas vai preparētas gonādas.

Testējamo koncentrāciju izvēle

24. Šā testa vajadzībām augstākā testējamās ķimikālijas koncentrācija ir vai nu diapazona noteikšanā, vai no citiem toksiskuma datiem konstatētā maksimāli pieļaujamā koncentrācija (turpmāk "MPK"), 10 mg/l, vai maksimālā šķīdība ūdenī — atkarībā no tā, kurš no šiem rādītājiem ir zemākais. MPK definē kā augstāko ķimikālijas testējamo koncentrāciju, kuras izraisītā mirstība nesasniedz 10 %. Šīs pieejas izmantošanai ir nepieciešami jau pieejami empīriski dati par akūto toksiskumu vai citi toksiskuma dati, ar kuriem iespējams noteikt MPK. MPK aplēšana var būt neprecīza, un parasti ir nepieciešams profesionāls viedoklis.

25. Ir nepieciešamas trīs testējamās koncentrācijas, kuras šķir nemainīgs koeficients, kas nepārsniedz 10, un atšķaidīšanas ūdens kontrole (un, ja vajadzīgs, šķīdinātāja kontrole). Ieteicamie atstatuma koeficienti ir no 3,2 līdz 10.

PROCEDŪRA

Testa zivju izraudzīšanās un svēršana

26. Ir svarīgi testa sākumā līdz minimumam samazināt zivju svara atšķirības. Piemērots izmēru diapazons dažādām sugām, ko ieteicams izmantot šajā testā, ir norādīts 2. papildinājumā. Visās testēšanā izmantoto zivju grupās katra atsevišķā zivju tēviņa un mātītes svara diapazons testa sākumā, ja iespējams, nepārsniedz ± 20 % no attiecīgā dzimuma vidējā aritmētiskā svara. Ieteicams pirms testēšanas nosvērt apakšparaugu no kopējā zivju parauga, lai novērtētu vidējo svaru.

Ekspozīcijas apstākļi

Ilgums

27. Testa ilgums ir 21 diena pēc pirmsekspozīcijas perioda. Ieteicamais pirmsekspozīcijas periods ir viena līdz divas nedēļas.

Barošana

28. Zivis *ad libitum* baro ar piemērotu barību (2. papildinājums) pietiekamā daudzumā, lai uzturētu ķermeņa stāvokli. Jāraugās, lai nepieļautu mikrobu augšanu un ūdens duļķainību. Vispārīgs ieteikums ir dienas barības devu

▼M7

sadalīt divās vai trīs vienādās daļās un dienā zivīm izbarot vairākās reizēs ar vismaz triju stundu starplaiku. Ir pieņemama viena lielāka dienas deva, jo īpaši nedēļas nogalēs. 12 stundas pirms paraugu ņemšanas vai autopsijas zivis nebaro.

29. Izvērtē, vai zivju barībā nav kontaminantu, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk "PAO") un polihlorbifenilu (turpmāk "PHB"). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu fitoestrogēnu līmeni, kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju uz zināmu estrogēnu agonistu (piemēram, 17-bestradiolu).

30. Neapēstā barība un fekālijas no testēšanas traukiem jāizņem vismaz divas reizes nedēļā, piemēram, katras tvertnes apakšdaļa rūpīgi jāiztīra, izmantojot sifonu.

Gaisma un temperatūra

31. Fotoperiods un ūdens temperatūra jāpielāgo testa sugai (sk. 2. papildinājumu).

Analītisko noteikšanu un mērījumu biežums

32. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķimikālijas piegādes sistēmas darbība. Jābūt apzinātām visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm, nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķīmisko stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā testējamās ķimikālijas koncentrācijas nosaka šādos regulāros starplaikos: atšķaidīšanas ūdens un izejšķīduma caurplūdumu vēlams pārbaudīt katru dienu, taču ne retāk kā divas reizes nedēļā, un testa laikā tas nedrīkst mainīties vairāk kā par 10 %. Ieteicams katrā tvertnē noteikt faktisko testējamās ķimikālijas koncentrāciju testa sākumā un reizi nedēļā pēc tam.

33. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja visā testa laikā šķīdumā ir uzturēta apmierinoša testējamās ķimikālijas koncentrācija ± 20 % no nominālās koncentrācijas, rezultātu var balstīt uz nominālajām vai izmērītajām vērtībām.

34. Paraugiem var būt vajadzīga filtrēšana (piemēram, ar poru lielumu 0,45 μm) vai centrifugēšana. Vajadzības gadījumā ieteicama centrifugēšana. Tomēr arī filtrēšana var būt pieņemama, ja testēšanas materiāls neadsorbējas uz filtriem.

35. Testa laikā visos testa traukos vismaz reizi nedēļā jāmēra izšķīdušais skābeklis, temperatūra un pH. Kontrolēs un vienā augstākās koncentrācijas traukā vismaz reizi nedēļā jāmēra kopējā cietība un sārmainība. Vismaz vienā testa traukā vēlams pastāvīgi uzraudzīt temperatūru.

Novērojumi

36. Testa laikā vai pēc tā beigām novērtē vairākas vispārīgas (piemēram, izdzīvotība) un bioloģiskas atbildreakcijas (piemēram, VTG līmeņi). Katru dienu kvantitatīvi jānovēro auglība. Turpmāk aprakstīta šo beigupunktu mērīšana, izvērtēšana un lietderība.

Izdzīvošana

37. Zivis testēšanas laikā katru dienu jāapskata, jāreģistrē mirstība un nedzīvās zivis iespējami drīz jāizvāc. Nedzīvās zivis neaizstāj ne ar kontrolgrupas zivīm, ne ar zivīm no cita apstrādes trauka. Gonādu makroskopiskā izmeklēšanā nosaka testēšanas laikā mirušo zivju dzimumu.

▼M7

Izturēšanās un izskats

38. Jāreģistrē jebkāda anormāla izturēšanās (salīdzinājumā ar kontrolgrupām); tās var būt vispārīgas toksiskuma pazīmes, tostarp hiperventilācija, nekoordinēta peldēšana, līdzsvara zudums un netipisks mierīgums vai barošanās. Jāreģistrē arī izskata anomālijas (piemēram, asinsizplūdumi, krāsas zaudēšana). Datu interpretēšanā šādas toksiskuma pazīmes jāvērtē uzmanīgi, jo tās var liecināt par koncentrācijām, kurās nevar paļauties uz endokrīnās sistēmas biomarķieriem. Šādos novērojumos par izturēšanos var iegūt arī noderīgu kvalitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamas vajadzības zivju testēšanā. Piemēram, novērots, ka androgēniskām vielām eksponēti melngalvas mailītes tēviņi vai maskulinizētas mātītes izturas teritoriāli agresīvi, savukārt zebrzivīm estrogēniskas vai antiandrogēniskas ekspozīcijas rezultātā samazinās vai kavējas ierastā pārošanās un nārstošanas aktivitāte pēc rītausmas.

39. Tā kā apiešanās var noteiktos aspektos (galvenokārt krāsa) ātri mainīt izskatu, kvalitatīvos novērojumus svarīgi veikt, pirms dzīvniekus izņem no testa sistēmas. Līdzšinējā pieredze ar melngalvas mailīti liecina, ka dažas endokrīni aktīvās ķimikālijas sākotnēji var inducēt šādas ārējas izmaiņas: ķermeņa krāsa (gaiša vai tumša), krāsojuma struktūra (vertikālu joslu parādīšanās) un ķermeņa forma (galvas un krūšu apvidus). Tāpēc zivju izskata novērojumi jāizdara visā testēšanas laikā un pētījuma beigās.

Auglība

40. Attiecībā uz replikātiem katru dienu jāreģistrē kvantitatīvi novērojumi par nārstošanu. Attiecībā uz replikātiem jāuzskaita ikru ražošana kā ikru skaits uz vienu izdzīvojušo mātīti dienā. Ikrus no testa kamerām izņem katru dienu. Lai zivis varētu nārstot normālos apstākļos, melngalvas mailītei un zebrzivij testa kamerā ievieto nārsta substrātus. 4. papildinājumā sniegta papildu informācija par zebrzivij (4.A. papildinājums) un melngalvas mailītei (4.B. papildinājums) ieteicamajiem nārsta substrātiem. Medakai nārsta substrātu nodrošināt nav nepieciešams.

Humāna zivju nonāvēšana

41. Testa 21. dienā, t. i., beidzot ekspozīciju, zivis eitanazē ar pietiekamu daudzumu trikaīna (trikaīna metāna sulfonāts, metakaīns, MS-222 (CAS 886-86-2)), 100–500 mg/l gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaidot ar 300 mg/l $NaHCO_3$ (nātrija bikarbonāts, CAS 144-55-8); pēc tam ņem asins vai audu paraugus, lai noteiktu VTG, kā paskaidrots iedaļā par vitelogenīnu.

Sekundāro dzimumpazīmju novērtēšana

42. Dažas endokrīni aktīvas ķimikālijas var inducēt specifiskas sekundāras dzimumpazīmju izmaiņas (melngalvas mailītes tēviņu nārsta kārpiņu skaits, Japānas medakas tēviņu kārpiņveida izaugumi). Proti, ķimikālijas ar konkrētu iedarbības veidu var izraisīt anormālu sekundāro dzimumpazīmju parādīšanos pretējā dzimuma dzīvniekiem, piemēram, tādu androgēna receptoru agonistu kā trenbolons, metiltestosterons un dihidrotestoterons ietekmē melngalvas mailīšu mātītēm var sākt veidoties izteiktas nārsta kārpiņas vai medakas

▼M7

mātītēm — kārpiņveida izaugumi (11, 20, 21). Ir ziņas arī par to, ka estrogēna receptoru agonisti pieaugušiem melngalvas mailīšu tēviņiem var samazināt nārsta kārpiņu skaitu un muguras skausta segmenta lielumu (26, 27). Šādu izteiktu morfoloģisko īpatnību novērojumi var sniegt arī noderīgu kvalitatīvu un kvantitatīvu informāciju, pēc kuras noteikt turpmākas iespējamas vajadzības zivju testēšanā. Melngalvas mailītes nārsta kārpiņu skaitu un lielumu un medakas kārpiņveida izaugumu skaitu kvantitatīvi noteikt var tieši vai, praktiskāk, saglabātiem paraugiem. Melngalvas mailītes un medakas sekundāro dzimumpazīmju noteikšanai ieteicamās procedūras norādītas attiecīgi 5.A un 5.B papildinājumā.

Vitelogenīns (VTG)

43. Ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārcaurulīti vai kardiālās punkcijas šļirci no astes artērijas/vēnas ņem asinis. Atkarībā no zivs lieluma no vienas melngalvas mailītes parasti ņem 5 līdz 60 µl un no zebrzivs — 5 līdz 15 µl. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot, un līdz VTG analīžu veikšanai, pievienojot proteāzes inhibitorus, glabā –80 °C temperatūrā. Par audu avotu VTG noteikšanai var izmantot arī medakas aknas un zebrzivs galvas vai astes homogenātu (6. papildinājums). VTG mērījuma pamatā jābūt validētai homologai *ELISA* metodei, kurā izmanto homologu VTG standartvielu un homologas antivielas. Ieteicams izmantot metodi, ar ko ir iespējams konstatēt VTG, kura daudzums ir tikai daži ng/ml plazmā (vai ng/mg audos), kas atbilst fona līmenim testēšanā neeksponētu zivs tēviņu organismā.

44. VTG analīzes kvalitātes kontrolē izmanto standartvielas, sagataves un vismaz atkārtotas analīzes. Lai noteiktu minimālo parauga atšķaidījuma koeficientu, attiecībā uz katru *ELISA* metodi jātestē matrices ietekme (paraugatšķaidījuma ietekme). Katrā VTG testos izmantotā *ELISA* testa platē jābūt šādiem kvalitātes kontroles paraugiem: vismaz 6 kalibrācijas standarti, kas atbilst paredzamo VTG koncentrāciju diapazonam, un vismaz viens nespecifisks saistīšanās testa "tukšais paraugs" (analizē dublikātparaugu). Absorbcijai šajos tukšajos paraugos jābūt zemākai par 5 % no absorbcijas, kas vērojama maksimālās kalibrācijas standartam. No katra parauga atšķaidījuma analizē vismaz divas alikvotas (dublikātiedobes). Dublikātiedobes, kas atšķiras vairāk par 20 %, jāanalizē atkārtoti.

45. Kalibrācijas līkņu korelācijas koeficientam (R^2) jāpārsniedz 0,99. Tomēr ar augstu korelāciju nepietiek, lai garantētu pietiekamu koncentrācijas prognozēšanu visos diapazonos. Papildus tam, ka jābūt pietiekami augstai korelācijai kalibrācijas līknē, katrai standarta koncentrācijai, ko aprēķina pēc kalibrācijas līknes, jābūt 70 līdz 120 % nominālās koncentrācijas. Ja nominālajām koncentrācijām (piemēram, zemākās koncentrācijās) ir tendence attālināties no kalibrācijas regresijas līknes, kalibrācijas līkni var būt nepieciešams sadalīt zemajā un augstajā diapazonā vai izmantot nelineāru modeli, kas pietiekami derētu absorbcijas datiem. Ja līkni sadala, abos līknes segmentos jābūt $R^2 > 0,99$.

46. Noteikšanas robeža (*LOD*) ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, bet kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LOQ*) ir zemākā analītiskā standarta koncentrācija, kas reizināta ar zemāko atšķaidījuma koeficientu.

47. Katrā VTG testu dienā analizē stiprinātu paraugu, kas gatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu (7. papildinājums). Prognozētās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību testēšanas pārskatā norāda kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testu kompleksa rezultātiem.

Gonādu histopatoloģijas novērtējums

48. Pārvaldes iestādes var pieprasīt veikt gonādu histopatoloģiju, lai izpētītu HPG ass mērķorgānu pēc tā eksponēšanas ķimikālijai. Šim nolūkam ar fiksatoru apstrādā veselas vai preparētas gonādas. Ja vajadzīga histopatoloģija, gonādā tiek meklētas specifiskas ar endokrīniem saistītas atbildreakcijas, lai būtu iespējams novērtēt testējamās ķimikālijas endokrīno aktivitāti. Būtiskās diagnostiskās atbildreakcijas ir oocīti sēkliniekos, Leidiga šūnu hiperplāzija, samazināta dzeltenuma veidošanās, palielināts spermatogonālo šūnu

▼M7

daudzums un perifolikulārā hiperplāzija. Pārējiem gonādu bojājumiem, piemēram, olšūnu atrēzijai, sēklinieku deģenerācijai un attīstības izmaiņām var būt dažādi cēloņi. Norāžu dokumentā par zivju gonādu histopataloģiju ir specificētas procedūras, kas jāizmanto gonādu secēšanā, fiksācijā, sekcijā un histopataloģiskā novērtēšanā (22).

DATI UN TESTĒŠANAS PĀRSKATS

Biomarķieru reakcijas novērtēšana ar dispersijas analīzi (turpmāk "*ANOVA*")

49. Lai noteiktu ķimikālijas iespējamo aktivitāti, dažādās apstrādes grupās un kontrolgrupās iegūtā atbildreakcija jāsalīdzina, izmantojot dispersijas analīzi (*ANOVA*). Ja izmanto šķīdinātāja kontrolgrupu, attiecīgu statistisku testu, kurā salīdzina atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, veic attiecībā uz katru beigupunktu. Norādījumi par to, kā ar datiem par atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu jārīkojas turpmākajā statistiskajā analīzē, atrodami OECD, 2006c (28). Visi bioloģiskās atbildreakcijas dati jāanalizē un testēšanas pārskatā jāiekļauj par katru dzimumu atsevišķi. Ja neizpildās parametriskajām metodēm vajadzīgie pieņēmumi – dati neatbilst normālsadalījumam (piemēram, Šapiro-Vilka tests) vai ir vērojama heterogēna dispersija (Bartleta tests vai Lēvena tests), jāapsver, vai pirms *ANOVA* veikšanas dati nebūtu jāpārveido tā, lai dispersijas homogenizētu, vai varbūt jāveic svērta *ANOVA*. Devas un atbildreakcijas nemonotonas sakarības gadījumā var izmantot Daneta (parametrisko) testu, kurā salīdzina vairākus pārus, vai Manna-Vitnija testu ar Bonferoni (neparametrisku) korekciju. Ja devas un atbildreakcijas sakarība ir aptuveni monotona, var izmantot citus statistiskos testus (piemēram, Džonkhīra-Terpstra testu vai Viljamsa testu). Lai būtu vieglāk lemt, kurš statistiskais tests būtu vispiemērotākais, 8. papildinājumā sniegta statistiska diagramma. Papildu informācija pieejama arī ESAO "*Document on Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*" (28).

Ziņojums par testa rezultātiem

50. Pētījuma rezultātos ietilpst:

Testēšanas laboratorija:

— atbildīgie darbinieki un viņu pienākumi pētījumā,

— katra laboratorija ir pierādījusi kvalifikāciju, izmantojot vairākas reprezentatīvas ķimikālijas.

Testējamā ķimikālija:

— testējamās ķimikālijas īpašības,

— fizikālais stāvoklis un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības,

— testējamo koncentrāciju pagatavošanas metode un biežums;

— informācija par stabilitāti un bionoārdāmību.

Šķīdinātājs:

— šķīdinātāja raksturojums (veids, izmantotā koncentrācija);

— šķīdinātāja izraudzīšanās pamatojums (ja šķīdinātājs nav ūdens).

▼M7

Testa dzīvnieki:

— sugas un līnija;

— piegādātājs un konkrētā piegādātājiestāde,

— zivju vecums testa sākumā un reproduktīvais/nārstošanas statuss;

— dati par dzīvnieku aklimatizācijas procedūru;

— zivju ķermeņa svars ekspozīcijas sākumā (zivju parauga apakšparaugs).

Testēšanas apstākļi:

— izmantotā testa metode (testa tips, noslogojums, apdzīvotības blīvums u. c.);

— izejšķīdumu pagatavošanas metode un caurplūdes;

— nominālās testējamās koncentrācijas, iknedēļas izmērītās testa šķīdumu koncentrācijas un izmantotā analīzes metode, mērījumu vidējās vērtības un standartnovirzes testa traukos un pierādījumi tam, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens īpašības (tostarp pH, cietība, sārmainība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, atlikušā hlora līmenis, kopējais organiskais ogleklis, suspendētas cietās daļiņas un citi veiktie mērījumi);

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, cietība, temperatūra un izšķīdušā skābekļa koncentrācija,

— detalizēta informācija par barošanu (piemēram, barības(-u) veids(-i), avots, izbarotais daudzums un barošanas biežums, kā arī attiecīgo piesārņotāju (piemēram, PHB, PAO un hlororganisko pesticīdu) analīzes, ja tādas ir veiktas)

Rezultāti

— apliecinājums, ka kontrolgrupas atbildušas testa pieņemamības kritērijiem;

— dati par mirstību ar jebkuru no testējamajām koncentrācijām un kontrolgrupās;

— izmantotās statistiskās analīzes metodes, datu apstrāde un izmantoto metožu pamatojums;

— bioloģisko novērojumu dati par morfoloģiskajām pazīmēm, arī par sekundārajām dzimumpazīmēm, ikru nēršanu un VTG;

— datu analīzes rezultāti, ieteicams — tabulu un grafiku veidā;

— novērojumi par zivju neraksturīgu izturēšanos un jebkāda redzama testējamās ķimikālijas izraisīta ietekme.

▼M7

NORĀDĪJUMI PAR TESTA REZULTĀTU INTERPRETĀCIJU UN PIEŅEMAMĪBU

51. Šajā iedaļā sniegti daži apsvērumi, kas jāņem vērā testa rezultātu interpretēšanā attiecībā uz dažādajiem mērītajiem beigupunktiem. Ja rezultāti liecina, ka testējamā ķimikālija izraisa acīmredzamu toksiskumu vai ietekmē testa dzīvnieka vispārīgo stāvokli, tie jāinterpretē piesardzīgi.

52. Nosakot testējamās ķimikālijas koncentrāciju diapazonu, jāraugās, lai netiktu pārsniegta maksimālā pieļaujamā koncentrācija, pie kuras iespējama jēgpilna datu interpretācija. Ir svarīgi veikt vismaz vienu apstrādi, kurā testējamās ķimikālijas toksiskās ietekmes pazīmes nav vērojamas. Slimību un toksiskas ietekmes pazīmes rūpīgi jānovērtē un jāatspoguļo ziņojumā. Piemēram, iespējams, ka VTG producēšanos zivju mātīšu organismā ietekmē arī vispārīgs toksiskums vai neendokrīna veida toksiska iedarbība, piemēram, hepatotoksiskums. Tomēr interpretāciju par ietekmi var nostiprināt, izmantojot citus apstrādes līmeņus, kuros nav vērojama sistēmiska toksiskuma maldinoša ietekme.

53. Attiecībā uz testa rezultātu pieņemamību jāņem vērā vairāki aspekti. Vispārīgs norādījums ir tāds, ka tēviņu un mātīšu organismā VTG līmeņiem kontrolgrupās attiecībā uz melngalvas mailītēm un zebrzivīm jābūt izteiktiem un jāatšķiras aptuveni par trīs lieluma kārtām un attiecībā uz Japānas medakām – aptuveni par vienu lieluma kārtu. Kontrolgrupās un apstrādes grupās novēroto vērtību diapazonu piemēri ir pieejami validācijas pārskatos (1, 2, 3, 4). Augstas VTG vērtības kontrolgrupas tēviņu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un tā spēju konstatēt vājus estrogēna agonistus. Zemas VTG vērtības kontrolgrupas mātīšu organismā var ietekmēt testa reaģētspēju un tā spēju konstatēt aromatāzes inhibitorus un estrogēna antagonistus. Norādījumos ir izmantoti validācijas pētījumi.

54. Ikru ražošanas kvantitatīvā noteikšana ir atkarīga no svarīgām variācijām [variācijas koeficients (CV) var variēties no 20 līdz 60 %], kas, CV tuvojoties 50 % vai augstākam procentam, ietekmē testa spēju noteikt būtisku par 70 % mazāku samazinājumu ikru ražošanā. Ja CV saglabājas zemākās robežās (apmēram 20–30 %), testam būs pieņemama jauda (80 %), un ar to varēs noteikt 40-50 % samazinājumu ikru ražošanā. Ja melngalvas mailītei izmanto testa plānu, kur katrā apstrādes līmenī ir četri replikāti, attiecībā uz auglības beigupunktu iegūst lielāku jaudu nekā ar testa plānu, kur ir tikai divi replikāti.

55. Ja laboratorija šādu testu iepriekš nav veikusi vai ja ir notikušas būtiskas pārmaiņas (piemēram, mainītas zivju līnijas vai piegādātājs), ir ieteicams veikt tehniskās kvalifikācijas pētījumu. Ieteicams izmantot ķimikālijas ar atšķirīgu iedarbības veidu vai ietekmi uz vairākiem testa beigupunktiem. Katra laboratorija tiek aicināta apkopot vēsturiskus kontroles datus par tēviņiem un mātītēm un veikt testu ar pozitīvu kontroles ķimikāliju, kurai ir zināma estrogēniska iedarbība (piemēram, 17β-estradiols koncentrācijā 100 ng/l vai zināms vājš agonists) un kura paaugstina VTG līmeni zivju tēviņu organismā, ar pozitīvu kontroles ķimikāliju, kura inhibē aromatāzi (piemēram, fadrozols vai prohlorāzs koncentrācijā 300 µg/l) un kura pazemina VTG līmeni zivju mātīšu organismā, un pozitīvu kontroles ķimikāliju, kurai ir androgēniska iedarbība (piemēram, 17β-trenbolons koncentrācijā 5 µg/l) un kura melngalvas mailītes un Japānas medakas mātītēm ierosina sekundāro dzimumpazīmju veidošanos. Lai būtu drošība par laboratorijas kvalifikāciju, šos datus var salīdzināt ar pieejamiem validācijas pētījumu datiem (1, 2, 3).

56. Kopumā VTG mērījumi jāuzskata par pozitīviem, ja salīdzinājumā ar kontrolgrupu vismaz augstākajā testēto vielu koncentrācijas līmenī ir konstatēts statistiski nozīmīgs VTG palielinājums ($p < 0,05$) tēviņu organismā vai statistiski nozīmīgs VTG samazinājums ($p < 0,05$) mātīšu organismā, un

▼M7

vispārīga toksiskuma pazīmes nav novērojamas. Pozitīvus rezultātus pamato, pierādot bioloģiski ticamu sakarību starp devu un atbildreakcijas līkni. Kā norādīts iepriekš, ne viss VTG samazinājums var būt endokrīnas izcelsmes, tomēr pozitīvs rezultāts kopumā jāinterpretē kā liecība par endokrīnu aktivitāti *in vivo*, un šādā gadījumā parasti ir jāveic papildu izmeklējumi, lai precizētu rezultātus.

57. Regulatori var prasīt gonādu histopataloģijas novērtējumu, lai noteiktu testa dzīvnieku reproduktīvo veselību un lai testa rezultātus varētu novērtēt pēc pierādījumu svara. Gonādu histopatoloģija var netikt prasīta, ja ir pozitīvs VTG vai kāda sekundāra dzimumpazīme (t. i., VTG palielinājums vai samazinājums vai sekundāro dzimumpazīmju inducēšanās).

LITERATŪRA

(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, Paris.

(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). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(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, Paris.

(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 (piekļuve 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 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, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. 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., *et al.* (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., *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). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(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*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼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. Aquatic Toxicology; 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. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(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 research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(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*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 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*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 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. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (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, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. No. 23. Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.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. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (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.

(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, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

1. papildinājums

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

CV: variāciju koeficients

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

HPG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass

Noslogojums: zivju mitrais svars uz vienu ūdens tilpuma vienību.

MPK: maksimāli pieļaujamā koncentrācija, kas atbilst aptuveni 10 % no letālās koncentrācijas LC_{50}.

Apdzīvotības blīvums: zivju skaits vienā ūdens tilpuma vienībā.

Testējamā ķimikālija: Jebkura viela vai maisījums, kuru testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

VTG: olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas organismā seksuāli aktīvām mugurkaulnieku mātītēm, kuras dēj olas/nērš ikrus.

▼M7

2. papildinājums

ZIVJU ENDOKRĪNĀS SISTĒMAS SKRĪNINGA TESTA EKSPERIMENTĀLIE APSTĀKĻI

1. Ieteicamās sugas	Melngalvas mailīte (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Zebrzivs (*Danio rerio*)
2. Testa veids	Caurplūde	Caurplūde	Caurplūde
3. Ūdens temperatūra	25 ± 2°C	25 ± 2°C	26 ± 2°C
4. Apgaismojuma kvalitāte	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra)
5. Gaismas intensitāte	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux vai 50-100 ft-c (līmenis laboratorijā)
6. Fotoperiods (rītausmas/krēslas pārejas ir ieteicamas, taču netiek neuzskatītas par nepieciešamām)	16 h gaisma, 8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa	12-16 h gaisma, 12-8 h tumsa
7. Noslogojums	< 5 g uz l	< 5 g uz l	< 5 g uz l
8. Testa kameras izmērs	10 l (minimālais izmērs)	2 l (minimālais izmērs)	5 l (minimālais izmērs)
9. Testa šķīduma tilpums	8 l (minimālais izmērs)	1,5 l (minimālais izmērs)	4 l (minimālais izmērs)
10. Testa šķīdumu tilpuma apmaiņu skaits	Vismaz 6 dienā	Vismaz 5 dienā	Vismaz 5 dienā
11. Testa organismu vecums	sk. 21. punktu.	sk. 21. punktu.	sk. 21. punktu.
12. Pieaugušu zivju aptuvenais mitrais svars (g)	Mātītes: 1,5 ± 20 % Tēviņi: 2,5 ± 20 %	Mātītes: 0,35 ± 20 % Tēviņi: 0,35 ± 20 %	Mātītes: 0,65 ± 20 % Tēviņi: 0,4 ± 20 %
13. Zivju skaits testa traukā	6 (2 tēviņi un 4 mātītes)	6 (3 tēviņi un 3 mātītes)	10 (5 tēviņi un 5 mātītes)
14. Apstrāžu skaits	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)	= 3 (plus attiecīgās kontrolgrupas)
15. Trauku skaits katrā apstrādē	Vismaz 4	Vismaz 4	Vismaz 2
16. Zivju skaits uz katru testējamo koncentrāciju	16 pieaugušas mātītes un 8 tēviņi (4 mātītes un 2 tēviņi katrā replikāta traukā)	12 pieaugušas mātītes un 12 tēviņi (3 mātītes un 3 tēviņi katrā replikāta traukā)	10 pieaugušas mātītes un 10 tēviņi (5 mātītes un 5 tēviņi katrā replikāta traukā)
17. Barošanas režīms	Dzīvas vai saldētas pieaugušas vai nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (*ad libitum*), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (*ad libitum*), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija	Nauplija stadijas okeāna garneles divas vai trīs reizes dienā (*ad libitum*), tirdzniecībā pieejama barība vai abu minēto veidu kombinācija

▼M7

18. Aerācija	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma	Nav, ja vien IS koncentrācija nav zemāka par 60 % no gaisa piesātinājuma
19. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors
20. Pirmsekspozīcijas periods	Ieteicams 7–14 dienas	Ieteicams 7–14 dienas	Ieteicams 7–14 dienas
21. Ķīmiskās ekspozīcijas ilgums	21 diena	21 diena	21 diena
22. Bioloģiskie beigupunkti	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — sekund. dzimumpazīmes — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — sekund. dzimumpazīmes — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija	— izdzīvotība — izturēšanās — auglība — VTG — pēc izvēles gonādu histopatoloģija
23. Testa pieņemamība	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 25 ± 2°C; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 25 ± 2°C; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.	Izšķīdušais skābeklis > 60 % piesātinājuma; vidējā temperatūra 26 ± 2°C; kontrolgrupās zivju izdzīvotība 90 %; izmērītās testa koncentrācijas 20 % robežās no vidējām izmērītajām vērtībām katrā apstrādes līmenī.

▼**M7**

3. papildinājums

DAŽAS PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS

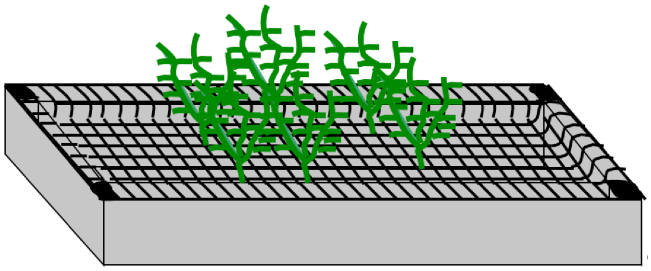
SASTĀVDAĻA	KONCENTRĀCIJAS
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Atlikušais hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

▼M7

4.A. papildinājums

ZEBRZIVS NĀRSTA SUBSTRĀTS

Nārstošanas paplāte: stikla instrumentu trauks, piemēram, 22 × 15 × 5.5 cm (g × p × dz), kas pārklāts ar noņemamu nerūsošā tērauda sietiņu (acs 2 mm). Sietiņam instrumentu trauka atvere jāpārklāj līdz noteiktam līmenim zem trauka malas.



Uz sietiņa fiksē nārsta substrātu. Tam vajadzētu būt materiālam, kurā zivis var iepeldēt. Piemēram, piemēroti ir mākslīgi akvārija augi no zaļa plastmasas materiāla (NB: jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas iespējamā adsorbēšanās uz plastmasas materiāla). Plastmasas materiāls pietiekami ilgi jāskalo pietiekamā daudzumā silta ūdens, lai nodrošinātu, ka testa ūdenī nenonāk nekādas ķīmiskas vielas. Ja izmanto stikla materiālus, jāgādā, ka zivis enerģisku kustību laikā nesavainojas vai netiek saspiestas.

Attālumam starp paplāti un tvertnes sienām jābūt vismaz 3 cm, lai nodrošinātu, ka nārstošana nenotiek ārpus paplātes. Uz paplātes iznērstie ikri izkrīt cauri sietiņam, un 45–60 minūtes pēc apgaismošanas sākuma no tiem var ņemt paraugus. Caurspīdīgie ikri ir nelīposi, un šķērsgaismā tos var viegli saskaitīt. Ja katrā traukā izmanto piecas mātītes, līdz 20 ikriem dienā uzskatāms par zemu, līdz 100 — par vidēju, bet vairāk nekā 100 — par augstu rādītāju. Nārsta paplāte jāizņem, ikri jāsavāc, un nārsta paplāte iespējami vēlu vakarā vai ļoti agri no rīta jāievieto atpakaļ testa traukā. Laiks līdz atpakaļievietošanai nedrīkstētu pārsniegt vienu stundu, citādi nārsta substrāta ievietošana var ierosināt individuālu pārošanos un nārstošanu neraksturīgā laikā. Ja ir kādi apstākļi, kuru dēļ paplāte jāievieto vēlāk, tas jāizdara vismaz 9 stundas pēc apgaismošanas sākuma. Tik vēlu dienā nārstošana vairs netiek ierosināta.

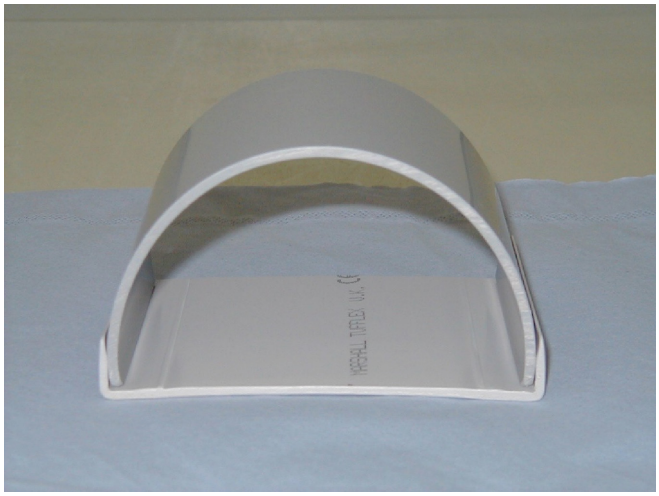
▼**M7**

4.A papildinājums

MELNGALVAS MAILĪTES NĀRSTA SUBSTRĀTS

Katrā testa kamerā ievieto divas vai trīs kombinētas plastmasas/keramikas/stikla vai nerūsošā tērauda nārsta flīzes vai paplātes (piemēram, 80 mm garu pelēku pusapaļu caurulīti, kas novietota uz 130 mm garas paplātes ar atlokiem) (sk. attēlu). Ir pierādīts, ka nārsta substrātam ir piemērotas attiecīgi sagatavotas PVC vai keramikas flīzes (*Thorpe et al*, 2007).

Lai uzlabotu saķeri, flīzes ieteicams padarīt abrazīvas. Paplātei ir vajadzīgs siets, lai zivis nevarētu piekļūt nokritušajiem ikriem, ja vien nav pierādīts, ka ikri efektīvi līp pie izmantotā nārsta substrāta.



Pamatne ir veidota tā, lai saturētu ikrus, kas nepielīp pie flīžu virsmas un nokrīt līdz tvertnes dibenam (vai ikrus, kas iznērsti tieši uz plakanās plastmasas pamatnes). Visus nārsta substrātus pirms izmantošanas vismaz 12 stundas skalo atšķaidīšanas ūdenī.

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.

▼M7

5.A papildinājums

MELNGALVAS MAILĪTES SEKUNDĀRO DZIMUMPAZĪMJU NOVĒRTĒŠANA NOTEIKTU ENDOKRĪNI AKTĪVU ĶĪMISKO VIELU DETEKTĒŠANAI

Pārskats

Testējot endokrīnos disruptorus, potenciāli svarīgas izskata pazīmes pieaugušām melngalvas mailītēm ir ķermeņa krāsa (t. i., gaiša vai tumša), krāsojuma struktūra (t. i., ir vai nav vertikālas joslas), ķermeņa forma (t. i., galvas un krūšu daļas forma, vēdera apvidus uzpūšanās) un īpašas sekundārās dzimumpazīmes (t. i., nārsta kārpiņu skaits un lielums, pakauša segmenta un dējekļa lielums).

Nārsta kārpiņas reproduktīvi aktīviem melngalvas mailītes tēviņiem atrodas uz galvas (uz pakauša segmenta) un parasti ir izkārtotas abpusēji simetriskā struktūrā (*Jensen et al.* 2001). Kontrolgrupas mātītēm un jauniem tēviņiem un mātītēm kārpiņu attīstīšanās nav novērojama (*Jensen et al.* 2001). Tēviņiem ap acīm un starp nāsīm var būt līdz astoņām atsevišķām kārpiņām. Vairums lielāko kārpiņu ir izkārtotas divās paralēlās līnijās tieši zem nāsīm un virs mutes. Daudzām zivīm kārpiņu grupas atrodas zem apakšžokļa; mutes tuvumā parasti atrodas viens kārpiņu pāris, tomēr tuvāk vēderam var atrasties līdz četrām kārpiņām. Kārpiņu reti ir vairāk nekā 30 (diapazons, 18–28; Jensen *et al*. 2001). Galvenās (skaita ziņā) kārpiņas ir atsevišķas, salīdzinoši apaļas struktūras, kuru augstums aptuveni līdzinās to rādiusam. Vairumam reproduktīvi aktīvo tēviņu ir arī vismaz dažas kārpiņas, kas ir tik palielinātas un izteiktas, ka nav atšķiramas kā atsevišķas struktūras.

Dažu endokrīni disruptīvu ķimikāliju ietekmē pretējā dzimuma īpatņiem var parādīties anormālas sekundārās dzimumpazīmes; piemēram, tādu androgēna receptoru agonistu kā 17α-metiltestosterona vai17β-trenbolona ietekmē melngalvas mailītes mātītēm var izveidoties nārsta kārpiņas (*Smith* 1974; *Ankley et al.* 2001; 2003), savukārt estrogēna receptoru agonistu ietekmē tēviņiem nārsta kārpiņu skaits vai izmērs var samazināties (Miles-Richardson *et al*. 1999; *Harries et al*. 2000).

Turpinājumā sniegts melngalvas mailītes nārsta kārpiņu apraksts, pamatojoties uz procedūrām, kuras izmanto ASV Vides aizsardzības aģentūras laboratorija Minesotas štata Dulutā (*U.S. Environmental Protection Agency lab in Duluth, MN*). Konkrētos izstrādājumus un/vai aprīkojumu var aizstāt ar līdzvērtīgiem pieejamiem materiāliem.

Aplūkošanu vislabāk veikt ar apgaismotu palielināmo stiklu vai apgaismotu mikroskopu ar 3X palielinājumu. Zivi apskata no aizmugures un no priekšpuses (ar galvu pret skatītāju).

— |Zivi ievieto mazā Petri platē (piemēram, ar 100 mm diametru), pavēršot to ar galvu pret skatītāju un ar vēderu uz leju. Fokusē skatu meklētāju, lai atrastu kārpiņas. Zivi uzmanīgi un lēni apveļ no viena sāna uz otru, lai noteiktu kārpiņu zonas. Saskaita kārpiņas un reģistrē to skaitu.

— Apskati atkārto uz galvas vēderpuses virsmas, Petri platē pavēršot zivi ar muguru pret skatītāju.

— Katra zivs jāapskata 2 minūšu laikā.

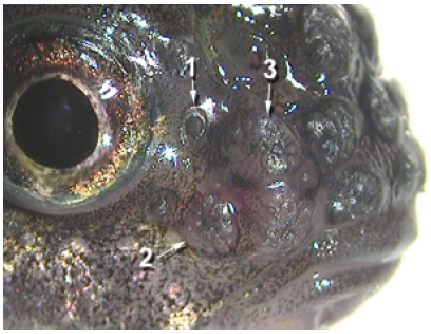
▼M7

Kārpiņu skaitīšana un novērtēšana

Melngalvas mailītēm ir identificētas sešas konkrētas zonas, kurās novērtē kārpiņu esamību un attīstīšanos. Ir sagatavota veidlapa, kurā var norādīt kārpiņu izvietojumu un daudzumu (sk. šī papildinājuma beigas). Kārpiņu skaitu reģistrē un to lielumu katram organismam kvantitatīvi novērtē atbilstoši šādai skalai: 0 – nav novērojama, 1 – ir novērojama, 2 – palielināta un 3 – izteikta (1. attēls).

Vērtējums 0 – kārpiņas nav novērojamas. Vērtējums 1 – ir novērojama; jebkura kārpiņa, kurai ir punkts, kurā tās augstums ir gandrīz vienāds ar tās rādiusu. Vērtējums 2 – palielināta; svarīgi, ka audi izskatās pēc zvaigznītes; parasti ar starveida pamatni un rievojumu no centrālās daļas. Kārpiņu augstums bieži vien ir nevienmērīgs, bet reizēm tās var būt apaļas. Vērtējums 3 – izteikta; parasti diezgan liela un noapaļota, ar mazāk izteiktu struktūru. Dažkārt šīs kārpiņas savienojas, izveidojot vienotu masu atsevišķā vai vairākās zonās (turpmāk norādītā B, C un D zona). Krāsojums un struktūra ir līdzīga vērtējumam 2, tomēr reizēm pazīmes ir diezgan neskaidras. Šajā kārpiņu novērtēšanas sistēmā kopējais punktu skaits normālam kontrolgrupas tēviņam ar 18–20 kārpiņām parasti ir < 50 (*Jensen et al. 2001*).

1. attēls



Dažām zivīm faktiski kārpiņu var būt vairāk nekā veidnei attiecīgajai novērtējuma zonai paredzēts rūtiņu. Šādā gadījumā papildu novērtējuma skaitļus var atzīmēt turpat pa labi vai pa kreisi no rūtiņas. Līdz ar to veidlapā nav jābūt simetrijai. Papildu iespēja tādu kārpiņu kartēšanai, kas izvietotas pa pāriem vai vertikāli savienojušās gar mutes horizontālo plakni, ir divas reizes atzīmēt divu kārpiņu novērtējuma punktus vienā rūtiņā.

Kartēšanas zonas.

A – ap aci izvietotas kārpiņas. Kartē muguras-vēdera virzienā ap acs priekšējo gredzenu. Pieaugušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti vairākas, kontrolgrupas mātītēm nav, androgēniem eksponētām mātītēm parasti pāris (pa vienai pie katras acs) vai viena.

B-kārpiņas starp nāsīm (sensoro kanālu porām). Vairāk nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti pa pāriem (2 – palielināta vai 3 – izteikta). Kontrolgrupas mātītēm nav novērojamas, bet reizēm novērojamas un attīstās androgēniem eksponētām mātītēm.

C – kārpiņas, kas novietotas tieši nāšu priekšā, paralēli mutei. Nobriedušiem kontrolgrupas tēviņiem parasti palielinātas vai izteiktas. Mazāk attīstītiem tēviņiem vai androgēniem eksponētām mātītēm novērojamas vai palielinātas.

▼**M7**

D – gar mutes līniju paralēli novietotas kārpiņas. Kontrolgrupas tēviņiem parasti tās vērtē kā attīstītas. Kontrolgrupas mātītēm to nav, bet androgēniem eksponētām mātītēm ir novērojamas.

E – kārpiņas uz apakšžokļa mutes tuvumā, parasti nelielas un pa pāriem. Mainīgā skaitā kontrolgrupas tēviņiem vai ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātiem tēviņiem un ar testējamo ķīmisko vielu apstrādātām mātītēm.

F – kārpiņas izvietotas vēdera virzienā no E zonas. Parasti nelielas un pa pāriem. Novērojamas kontrolgrupas tēviņiem un androgēniem eksponētām mātītēm.

ATSAUCES

(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 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Kārpiņu veidlapa:

ID_____

Datums ____

Kopskaits _____

Skaitliskais novērtējums

1 – ir novērojamas

2 – palielināta

3 – izteikta

	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

5.B papildinājums

JAPĀNAS MEDAKAS SEKUNDĀRO DZIMUMPAZĪMJU NOVĒRTĒŠANA NOTEIKTU ENDOKRĪNI AKTĪVU ĶĪMISKO VIELU DETEKTĒŠANAI

Turpinājumā sniegts medakas (*Oryzias latipes*) sekundāro dzimumpazīmju — kārpiņveida izaugumu ([1]) — mērījumu apraksts.

(1) Pēc aknu izgriešanas (6. papildinājums) ķermeni ievieto koniskā centrifūgas stobriņā, kas satur 10 ml 10 % neitrāla formalīna buferšķīduma (augšpusē: galva, lejpusē: aste). Ja gonāda ir fiksēta šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums, ar nazi veic šķērsenisku griezienu starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri, raugoties, lai nebojātu ģenitālo poru un pašu gonādu (3. attēls). Zivs ķermeņa priekšējo daļu ievieto fiksējošā šķīdumā, lai saglabātu gonādu, bet zivs astes daļu — 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, kā norādīts iepriekš.

(2) Kad zivs ķermenis ievietots 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, ar pinceti satver anālās spuras priekšējo daļu un aptuveni uz 30 sekundēm to saliec, lai anālā spura būtu atvērta. Anālo spuru ar pinceti uzmanīgi satver aiz dažiem priekšējās daļas stariem tā, lai nesaskrambātu kārpiņveida izaugumus.

(3) Pēc tam, kad anālā spura 30 sekundes ir turēta atplesta, zivs ķermeni līdz kārpiņveida izaugumu mērīšanai (jāmēra pēc vismaz 24 stundu fiksācijas) glabā istabas temperatūras 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.

Mērīšana

(1) Pēc tam, kad zivs ķermenis vismaz 24 stundas fiksēts 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā, to no koniskā centrifūgas stobriņa izņem un ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieli) nosusina formalīnu.

(2) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Tad uzmanīgi ar mazām secēšanai paredzētām šķērēm nogriež anālo spuru (anālo spuru ieteicams nogriezt kopā ar nelielu pterigiofora daudzumu).

(3) Nogrieztās anālās spuras priekšējo daļu satver ar pinceti un noliek uz priekšmetstikliņa, uz kura ir daži pilieni ūdens. Pēc tam anālo spuru pārklāj ar segstikliņu. Anālo spuru ar pinceti satver saudzīgi, lai nesaskrambātu kārpiņveida izaugumus.

(4) Izmantojot skaitītāju zem bioloģiskā mikroskopa (stateniskā mikroskopa vai invertētā mikroskopa), saskaita spuras staru skrimšļa posmus ar kārpiņveida izaugumiem. Kārpiņveida izaugumus atzīst tad, ja uz spuras staru skrimšļa posmu aizmugurējās daļas ir redzami nelieli izaugumi. Tabulā ieraksta spuras

([1]) Kārpiņveida izaugumi parasti ir novērojami tikai pieaugušiem tēviņiem, un tie atrodas uz anālās spuras no otrā līdz septītajam vai astotajam spuru staram, skaitot no anālās spuras aizmugurējā gala (1. un 2. attēls). Tomēr kārpiņveida izaugumi tikai retumis ir vērojami uz pirmā spuras stara no anālās spuras aizmugurējā gala. Šī standartoperāciju procedūra (turpmāk "SOP") attiecas arī uz to, kā mēra kārpiņveida izaugumus uz pirmā spuras stara (šajā SOP spuras stara kārtas skaitlis norāda staru secību no anālās spuras aizmugurējā gala).

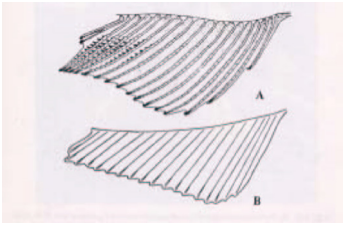
▼M7

staru skrimšļa posmu skaitu katrā spuru kaulā (piemēram, pirmais spuru kauls: 0, otrais spuru kauls: 10, trešais spuru kauls: 12, utt.) un par katru zivi *Excel* tabulā ieraksta šo skaitļu summu. Ja nepieciešams, anālo spuru nofotografē un spuru staru skrimšļa posmos esošos kārpiņveida izaugumus saskaita fotogrāfijā.

(5) Pēc mērīšanas anālo spuru ievieto glabāšanai 1. punktā minētajā konusveida kolbā.

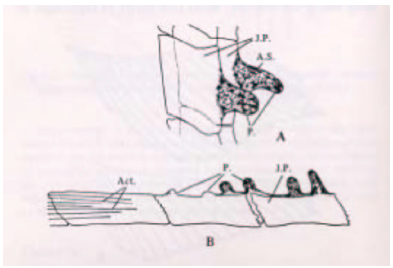
1. att.

Anālās spuras formas un lieluma atšķirības starp dzimumiem. A, tēviņš; B, mātīte. *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.



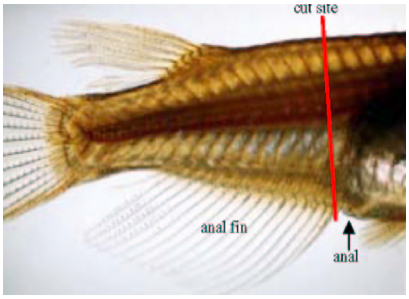
2. att.

A – izaugumi uz anālās spuras staru skrimšļa posmiem. J.P. – skrimšļa posmi, A.S.- attālums starp asīm; P – process. B – anālās spuras distālais izvirzījums. Aktinotrihija šķiedras (Act.) atrodas spuras galā. *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.



3. att.

Zivs ķermeņa fotogrāfija, kurā redzama griezuma vieta, kur gonāda ir fiksēta fiksējošā šķīdumā, kas nav 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums. Šajā gadījumā atlikušo ķermeņa daļu ar bārdas nazi nogriež starp anālās spuras priekšējo daļu un anālo atveri (sarkanā līnija), un zivs ķermeņa priekšdaļu ievieto gonādai paredzētajā fiksējošajā šķīdumā, bet zivs ķermeņa astes daļu ievieto 10 % neitrālā formalīna buferšķīdumā.



▼M7

6. papildinājums

IETEICAMĀ PARAUGU ŅEMŠANAS KĀRTĪBA VITELOGENĪNA ANALĪZEI

Jāuzmanās, lai tēviņu un mātīšu VTG paraugi savstarpēji nekontaminētos.

1.A procedūra. Melngalvas mailīte; asins ņemšana no astes vēnas/artērijas

Pēc anestezēšanas ar skalpeļa asmeni daļēji atdala astes stumbru un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilārmēģeni no astes vēnas/artērijas ievāc asinis. Pēc asins parauga paņemšanas plazmu ātri atdala, centrifugējot 3 minūtes ar paātrinājumu 15 000 *g* (vai 10 minūtes ar paātrinājumu 15 000 *g* 4 °C temperatūrā). Ja vēlas, pēc centrifugēšanas var noteikt hematokrīta līmeni. Tad plazmas daļu no mikrohematokrīta mēģenes izņem un glabā centrifūgas mēģenē ar 0,13 vienībām aprotinīna (proteāzes inhibitors) –80°C temperatūrā, līdz ir iespējama VTG noteikšana. Atkarībā no melngalvas mailītes lieluma (atkarīgs no dzimuma) ievācamā asins parauga tilpums parasti ir 5 līdz 60 mikrolitri no zivs (Jensen *et al.* 2001).

1.B procedūra. Melngalvas mailīte; asins ņemšana no sirds

Asinis var ņemt arī ar sirds punkcijas metodi, izmantojot heparinizētu šļirci (1 000 heparīna vienības uz ml). Asinis ievieto Ependorfa mēģenēs (uz ledus) un centrifugē (5 minūtes, 7 000 *g*, istabas temperatūra). Plazmu ievieto tīrās Ependorfa mēģenēs (ja ar plazmas daudzumu tas iespējams, alikvotās) un līdz analīzes veikšanai nekavējoties sasaldē –80°C temperatūrā (*Panter et al.*, 1998).

2.A procedūra. Japānas medaka; medakas aknu izgriešana

Testa zivju izņemšana no testa kameras

(1) Testa zivis no testa kameras izņem ar sietiņkaroti. Jāraugās, lai testa zivis neiekristu citās testa kamerās.

(2) Principā testa zivis izņem šādā secībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgos gadījumos), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvā kontrolgrupa. Turklāt no vienas testa kameras vispirms izņem visus tēviņus, tikai pēc tam izņem mātītes.

(3) Pēc ārējām sekundārām dzimumpazīmēm (piemēram, pēc anālās spuras formas) nosaka katras testa zivs dzimumu.

(4) Testa zivi ievieto pārvietošanas traukā un pārnes uz darba vietu, kur notiek aknu izgriešana. Pēc marķējuma pārbauda testa kameru un pārvietošanas trauku un pārliecinās, ka no testa kameras izņemto zivju skaits un testa kamerā palikušo zivju skaits atbilst gaidītajam.

(5) Ja dzimumu nav iespējams noteikt pēc zivju izskata, no testa kameras izņem visas zivis. Šādā gadījumā dzimumu nosaka, gonādu vai sekundārās dzimumpazīmes aplūkojot ar stereoskopisko mikroskopu.

Aknu izgriešana

(1) Testa zivis no pārvietošanas trauka ar nelielu sietiņkaroti ieceļ anestēzijas šķīdumā.

▼M7

(2) Pēc testa zivju anestezēšanas tās ar pinceti (patēriņu preču tips) novieto uz filtrpapīra (vai uz papīra dvieļa). Testa zivi ar pinceti satver aiz galvas sāniem, lai nesalauztu asti.

(3) Ūdeni no testa zivs virsmas nosusina ar filtrpapīru (vai ar papīra dvieli).

(4) Zivi novieto ar vēderu uz augšu. Pēc tam ar secēšanas šķērēm veic nelielu šķērsenisku iegriezumu pusceļā starp kakla vēderpuses daļu un vēdera vidusdaļu.

(5) Secēšanas šķēres ievieto nelielajā iegriezumā un pa vēdera viduslīniju uzšķērž vēderu no bronhu apvalka astes puses punkta līdz anālajai atverei galvaskausa pusē. Jāraugās, lai secēšanas šķēres neievietotu pārāk dziļi, bojājot aknas vai gonādu.

(6) Zem stereoskopiskā mikroskopa veic šādas darbības.

(7) Testa zivi ar vēderu uz augšu novieto uz papīra dvieļa (ir pieejama arī stikla Petri plate vai priekšmetstikliņš).

(8) Ar precīzijas pinceti papleš vēdera dobuma sienas un izņem iekšējos orgānus. Ja nepieciešams, atdalot vienu no vēdera dobuma sienām, var izņemt iekšējos orgānus.

(9) Ar vēl vienu precīzijas pincešu pāri vēdera dobumu paver tā, lai būtu redzamas aknu un žultspūšļa savienojuma vieta. Tad satver žultsceļu un nogriež žultspūsli. Jāraugās, lai žultspūslis nepārplīstu.

(10) Satver barības vadu un tādā pašā veidā no aknām atdala kuņģa un zarnu traktu. Jāraugās, lai neizlītu kuņģa un zarnu trakta saturs. Kuņģa un zarnu traktu astes pusē atdala no anālās atveres, un traktu izņem no vēdera dobuma.

(11) No aknām notīra taukus un citus audus. Jāraugās, lai aknas nesaskrambātu.

(12) Ar precīzijas pinceti satver aknu portālo zonu, un aknas izņem no vēdera dobuma.

(13) Aknas novieto uz priekšmetstikliņa. Ja nepieciešams, ar precīzijas pinceti no aknu virsmas noņem palikušos taukus un svešos audus (piemēram, vēderplēvi).

(14) Aknas ievieto 1,5 ml mikromēģenē, ko izmanto par taru, un ar elektroniskiem analītiskajiem svariem nosaka aknu svaru. Vērtību reģistrē darba lapā (nolasījuma precizitāte: 0,1 mg). Pārbauda identifikācijas informāciju uz mikromēģenes etiķetes.

(15) Mikromēģenei, kurā ir aknas, uzliek vāciņu. Mikromēģeni glabā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).

(16) Pēc vienu aknu izgriešanas secēšanas instrumentus notīra vai aizvieto ar tīriem instrumentiem.

▼M7

(17) Pēc šiem norādījumiem aknas izņem visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm.

(18) Kad visām pārvietošanas traukā esošajām zivīm aknas ir izņemtas (t. i., visiem testa kameras tēviņiem vai mātītēm), visus aknu paraugus ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un noglabā saldētavā. Ja aknas drīz pēc izgriešanas nodod priekšapstrādei, paraugus uz nākamo darba vietu nogādā dzesēšanas statīvā (vai statīvā ar ledu).

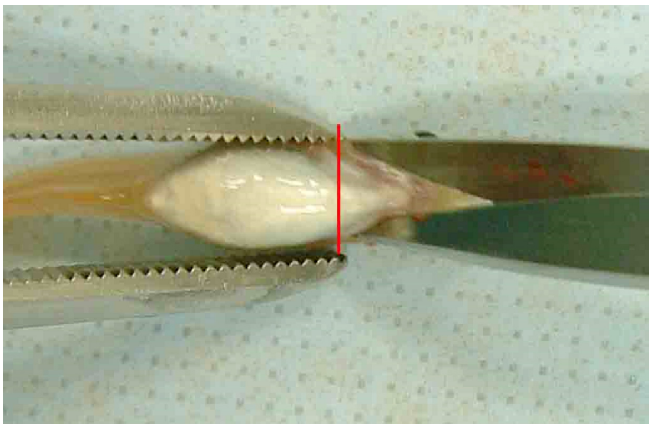
Pēc aknu izgriešanas zivs ķermeni var izmantot gonādu histoloģijai un sekundāro dzimumpazīmju mērīšanai.

Paraugi

Ja testa zivju aknu paraugus drīz pēc izgriešanas nenodod priekšapstrādei, tos glabā ≤ – 70°C temperatūrā.

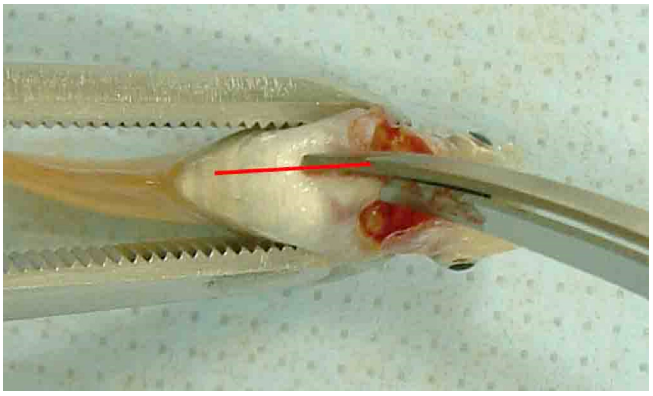
1. att.

Ar šķērēm izdara griezumu tieši pirms krūšuspurām.



2. att.

Ar šķērēm līdz punktam aptuveni 2 mm no anālās atveres galvas virzienā uzšķērž vēdera viduslīniju.



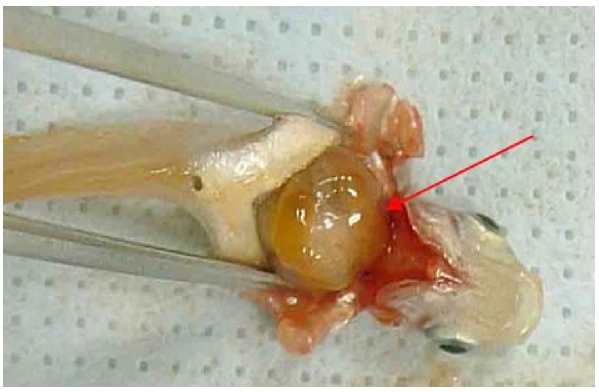
▼M7

3. att.

Vēdera sienas papleš ar knaiblītēm, lai atsegtu aknas un citus iekšējos orgānus.

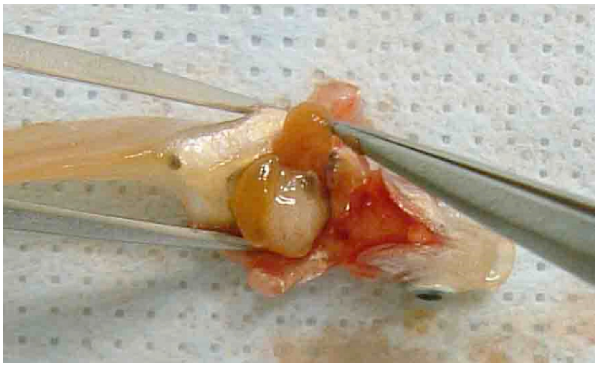
(Vēdera sienas var ar adatām atspraust uz sāniem.)

Bultiņa rāda uz aknām.



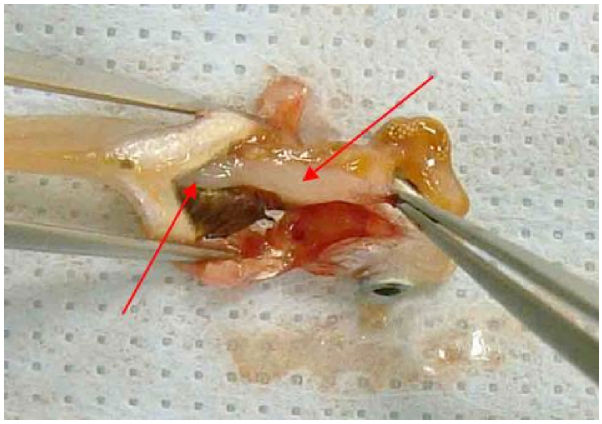
4. att.

Atdala un ar knaiblītēm izgriež aknas.



5. att.

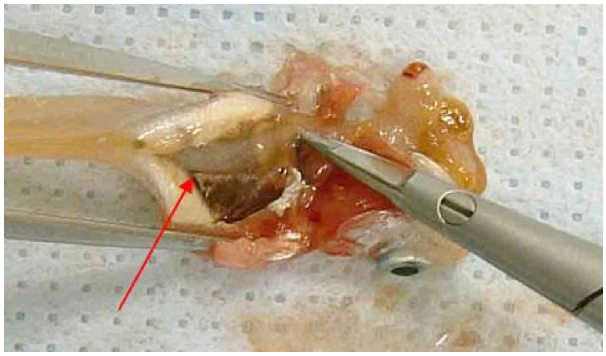
Ar knaiblītēm saudzīgi atvirza zarnas.



▼M7

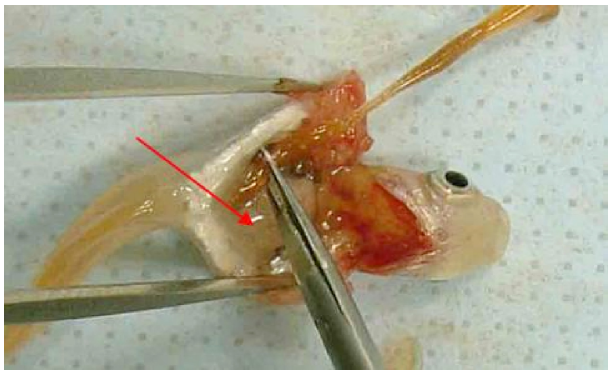
6. att.

Ar šķērēm atdala abus zarnu galus un jebkādas apzarņa daļas.



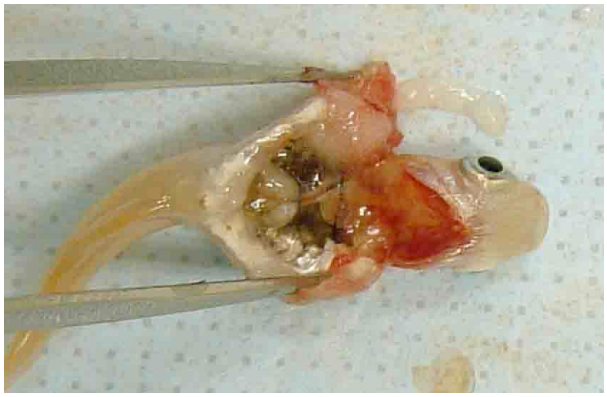
7. att. (mātīte)

Mātītēm veic identisku procedūru.



8. att.

Pabeigta procedūra.



▼M7

2.B procedūra. Japānas medaka (*Oryzias latipes*), aknu priekšapstrāde vitelogenīna analīzes veikšanai

No *ELISA* komplekta ņem homogenāta buferšķīduma pudelīti un to atdzesē sasmalcināta ledus šķīdumā (šķīduma temperatūra: ≤ 4°C). Ja izmanto *EnBio ELISA* sistēmas homogenāta buferšķīdumu, šķīdumu istabas temperatūrā atkausē, bet pēc tam pudelīti dzesē sasmalcināta ledus šķīdumā.

Homogenāta buferšķīduma daudzumu aknām aprēķina, pamatojoties uz to svaru (uz 1 mg aknu svara pievieno 50 µl homogenāta buferšķīduma). Piemēram, ja aknu svars ir 4,5 mg, homogenāta buferšķīduma tilpums aknām ir 225 µl. Sagatavojiet homogenāta buferšķīduma tilpuma sarakstu visām aknām.

Aknu sagatavošana priekšapstrādei

(1) 1,5 ml mikromēģeni ar aknām no saldētavas izņem tieši pirms priekšapstrādes.

(2) Lai nepieļautu kontaminēšanos ar vitelogenīnu, tēviņu aknām priekšapstrādi veic, pirms apstrādā mātīšu aknas. Turklāt priekšapstrādi testa grupām veic šādā secībā: kontrolgrupa, šķīdinātāja kontrolgrupa (attiecīgā gadījumā), zemākās koncentrācijas grupa, vidējās koncentrācijas grupa, augstākās koncentrācijas grupa un pozitīvā kontrolgrupa;

(3) Vienlaicīgi no saldētavas izņem 1,5 ml mikromēģenes ar aknu paraugiem, ne vairāk, kā attiecīgajā brīdī iespējams centrifugēt.

(4) 1,5 ml mikromēģenes ar aknu paraugiem sakārto paraugu numuru secībā statīvā ar ledu (aknas atkausēt nav nepieciešams).

Priekšapstrādes veikšana

1) homogenāta buferšķīduma pievienošana

Sarakstā pārbauda attiecīgajam aknu paraugam izmantojamo homogenāta buferšķīduma tilpumu, un mikropipeti (tilpuma diapazons: 100–1 000 µl) pielāgo attiecīgajam daudzumam. Mikropipetei uzliek tīru uzgali.

1,5 ml mikromēģenē ar aknām no reaģenta pudelītes pievieno homogenāta buferšķīdumu.

Ievērojot iepriekš norādīto procedūru, homogenāta buferšķīdumu pievieno visām 1,5 ml mikromēģenēm ar aknām. Mikropipetes uzgali nav nepieciešams aizstāt ar jaunu. Tomēr, ja uzgalis ir kontaminēts vai varētu tāds būt, tas jānomaina.

2) Aknu homogenizācija

— Mikromēģenes homogenizatoram pievieno jaunu homogenizācijas piestu.

— Piestu ievieto 1,5 ml mikromēģenē. Mikromēģenes homogenizatoru tur tā, lai aknas piespiestu starp piestas virsmu un 1,5 ml mikromēģenes iekšējo sieniņu;

— Mikromēģenes homogenizatoru darbina 10 līdz 20 sekundes. Procesa laikā 1,5 ml mikromēģeni dzesē ar sasmalcinātu ledu.

▼M7

— Piestu no 1,5 ml mikromēģenes izceļ un nogaida aptuveni 10 sekundes. Pēc tam suspensiju pārbauda vizuāli;

— Ja suspensijā ir novērojami aknu gabaliņi, (3) un (4) darbību atkārto, līdz ir sagatavots pieņemams aknu homogenāts.

— Suspendēto aknu homogenātu līdz centrifugēšanai dzesē statīvā ar ledu.

— Pēc katra homogenāta sagatavošanas piestu aizstāj ar jaunu.

— Visas aknas homogenizē ar homogenāta buferšķīdumu, ievērojot iepriekš norādīto procedūru.

3) Suspendēto aknu homogenāta centrifugēšana

— Pārliecinās, ka atdzesētajā centrifūgas kamerā temperatūra ir ≤ 5°C.

— 1,5 ml mikromēģenes ar suspendēto aknu homogenātu ievieto atdzesētā centrifūgā (ja, nepieciešams, noregulē līdzsvaru).

— Suspendēto aknu homogenātu 10 min. centrifugē ar 13 000 g ≤ 5°C. Tomēr, ja supernatanti ir pietiekami atdalīti, centrifugēšanas spēku un ilgumu var pielāgot pēc vajadzības.

— Pēc centrifugēšanas pārliecinās, ka supernatanti ir pietiekami atdalīti (virsslānis: lipīdi, vidējais slānis: supernatants, apakšslānis: aknu audi). Ja atdalījums nav pietiekams, suspensiju centrifugē vēlreiz, ievērojot tos pašus nosacījumus.

— Visus paraugus izņem no atdzesētās centrifūgas un paraugu numuru secībā sakārto statīvā ar ledu. Jāraugās, lai atdalītie slāņi pēc centrifugēšanas atkal nesuspendētos.

4) Supernatanta ievākšana

— Mēģeņu statīvā ievieto četras supernatanta glabāšanai paredzētas 0,5 ml mikromēģenes.

— Ar mikropipeti ievāc 30 µl katra supernatanta (atdalīts kā vidējais slānis) un ievada vienā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa.

— Tādā pašā veidā supernatantu ievāc un ievada citās divās 0,5 ml mikromēģenēs.

— Ar mikropipeti ievāc atlikušo supernatantu (ja iespējams: ≥ 100 µl). Pēc tam supernatantu ievada atlikušajā 0,5 ml mikromēģenē. Jāraugās, lai neievāktu lipīdus no virsslāņa vai aknu audus no apakšslāņa.

— 0,5 ml mikromēģeni aiztaisa ar vāciņu un uz etiķetes norāda supernatanta tilpumu. Pēc tam mikromēģenes nekavējoties atdzesē statīvā ar ledu.

— Katra supernatanta ievākšanai mikropipetes uzgali aizstāj ar jaunu. Ja uzgalim pielīp liels daudzums lipīdu, uzgali nekavējoties aizstāj ar jaunu, lai nepieļautu aknu ekstrakta piesārņošanos ar taukiem.

▼M7

— Saskaņā ar iepriekš aprakstīto procedūru visu centrifugēto supernatantu ievada četrās 0,5 ml mikromēģenēs.

— Pēc supernatanta ievadīšanas 0,5 ml mikromēģenēs tās visas ievieto mēģeņu statīvā ar identifikācijas etiķeti un nekavējoties sasaldē saldētavā. Ja VTG koncentrācijas mēra tūlīt pēc priekšapstrādes, vienu 0,5 ml mikromēģeni (ar 30 µl supernatanta) atstāj dzesēties mēģeņu statīvā un nogādā darba vietā, kurā veic *ELISA* testu. Šādā gadījumā pārējās mikromēģenes ievieto mēģeņu statīvos un sasaldē saldētavā.

— Pēc supernatanta ievākšanas atliekas attiecīgi likvidē.

Paraugu glabāšana

Līdz izmantošanai *ELISA* aknu homogenāta supernatantu saturošās 0,5 ml mikromēģenes glabā ≤ –70 °C temperatūrā.

3.A procedūra. Zebrzivs; asins ņemšana no astes vēnas/artērijas

Uzreiz pēc anestēzijas astes stumbru šķērseniski atdala un ar heparinizētu mikrohematokrīta kapilāra mēģeni no astes artērijas/vēnas izvada asinis. Asins tilpums atkarībā no zivs lieluma var būt 5 līdz 15 mikrolitri. Mikrokapilāra mēģenē pievieno tādu pašu tilpumu aprotinīna buferšķīduma (6 mikrogrami/ml fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā (PBS)) un centrifugējot atdala plazmu no asinīm (5 minūtes pie 600 g). Plazmu ievāc testa mēģenēs un līdz VTG vai citu interesējošo proteīnu analizēšanai glabā –20°C temperatūrā.

3.B procedūra. Zebrzivs; asins ņemšana ar sirds punkciju

Lai nepieļautu asins koagulāciju un proteīnu noārdīšanos, paraugus ievāc fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā (PBS), kas satur heparīnu (1 000 vienības/ml) un proteāzes inhibitoru aprotinīnu (2 TIU/ml). Ieteicamās buferšķīduma sastāvdaļas ir heparīns, amonija sāls un liofilizētais aprotinīns. Asins paraugu ņemšanai ieteicams izmantot šļirci (1 ml) ar fiksētu smalku adatu (piemēram, *Braun Omnikan-F*). Šļircē iepriekš iepilda buferšķīdumu (aptuveni 100 mikrolitri), lai no katras zivs pilnībā eluētu mazus asins tilpumus. Asins paraugus ņem, izmantojot sirds punkciju. Vispirms zivi ar MS-222 (100 mg/l) anestezē. Pareizā anestēzijas līmenī iespējams noteikt zebrzivs sirdsdarbību. Veicot sirds punkciju, uz šļirces virzuli izdara nelielu spiedienu. Asins parauga tilpums var būt 20–40 mikrolitri. Pēc sirds punkcijas asins un buferšķīduma maisījums jāiepilda testa mēģenē. Plazmu no asinīm atdala centrifugējot (20 min; 5 000 g) un līdz nepieciešamo analīžu veikšanai glabā –80°C temperatūrā.

3.C procedūra. SOP: zebrzivs; galvas un astes homogenizācija

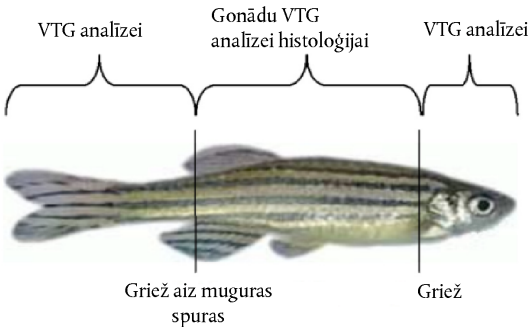
1. Zivis atbilstoši testēšanas procedūrai anestezē un eitanazē.

2. Zivīm atbilstoši 1. attēlam nogriež galvu un asti.

Svarīgs atgādinājums: *Pirms katras nākamās zivs apstrādes visi sadalīšanas instrumenti un griešanas paliktnis pienācīgi jānoskalo un jānotīra (piemēram, ar 96 % etanolu), lai neeksponētu tēviņu organismus "nepiesārņotu ar vitelogenīnu" no mātītēm vai ķīmiskajai vielai eksponētiem tēviņiem.*

▼M7

1. attēls



3. Katras zivs apvienoto galvas un astes svaru nosaka, noapaļojot līdz tuvākajam mg.
4. Pēc nosvēršanas zivs daļas ievieto attiecīgās mēģenēs (piemēram, 1,5 mg Ependorfa mēģenēs) un līdz homogenizēšanai sasaldē –80°C temperatūrā vai tieši homogenizē uz ledus ar diviem plastmasas irbuļiem. (Ja darbības veic uz ledus un tiek iegūta viendabīga masa, var izmantot citas metodes.) Svarīgs atgādinājums: *Mēģenes pienācīgi numurē, lai zivs galva un aste būtu sasaistāma ar attiecīgo ķermeņa daļu, ko izmanto gonādas histoloģijai.*
5. Pēc viendabīgas masas iegūšanas pievieno ledus temperatūras **homogenizācijas buferšķīdumu** ([1]), kura svars 4 reizes pārsniedz audu svaru. Turpina darboties ar irbuļiem, līdz iegūst viendabīgu maisījumu. Svarīga piezīme: *Katrai zivij izmanto jaunus irbuļus*.
6. Līdz 30 min centrifugēšanai **4°C** temperatūrā pie 50 000 *g* paraugus novieto uz ledus.
7. Ar pipeti vismaz divās mēģenēs katrā iepilda 20 µl supernatanta, pipetes uzgali ievietojot zem virspusē esošā tauku slāņa un rūpīgi iesūcot supernatantu bez tauku vai plāksnīšu daļiņām.
8. Līdz izmantošanai mēģenes glabā – 80°C temperatūrā.

([1]) Homogenizācijas buferšķīdums:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 2;% proteāzes inhibitora maisījums (Sigma)): 12 2;ml Tris-HCl pH 7,4 2;+ 2;120 µl proteāzes inhibitora maisījums.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), piemēram, no Bie & Berntsen, Dānija.
— Proteāzes inhibitora maisījums: no Sigma (zīdītāju audiem); produkta numurs P 8340.
PIEZĪME. Homogenizācijas buferšķīdums jāizmanto ražošanas dienā. Izmantošanas laikā to novieto uz ledus.

▼M7

7.papildinājums

STIPRINĀTI VITELOGENĪNA PARAUGI UN VAIRĀKIEM TESTIEM KOPĪGA REFERENCES STANDARTVIELA

Katrā VTG testu dienā analizē stiprinātu paraugu, kas gatavots, izmantojot vairākiem testiem kopīgu references standartvielu (7. papildinājums). Testiem kopīgās references standartvielas pagatavošanai izmantotais VTG nedrīkst būt no tās partijas, ko izmanto veicamā testa kalibrācijas standartu sagatavošanā.

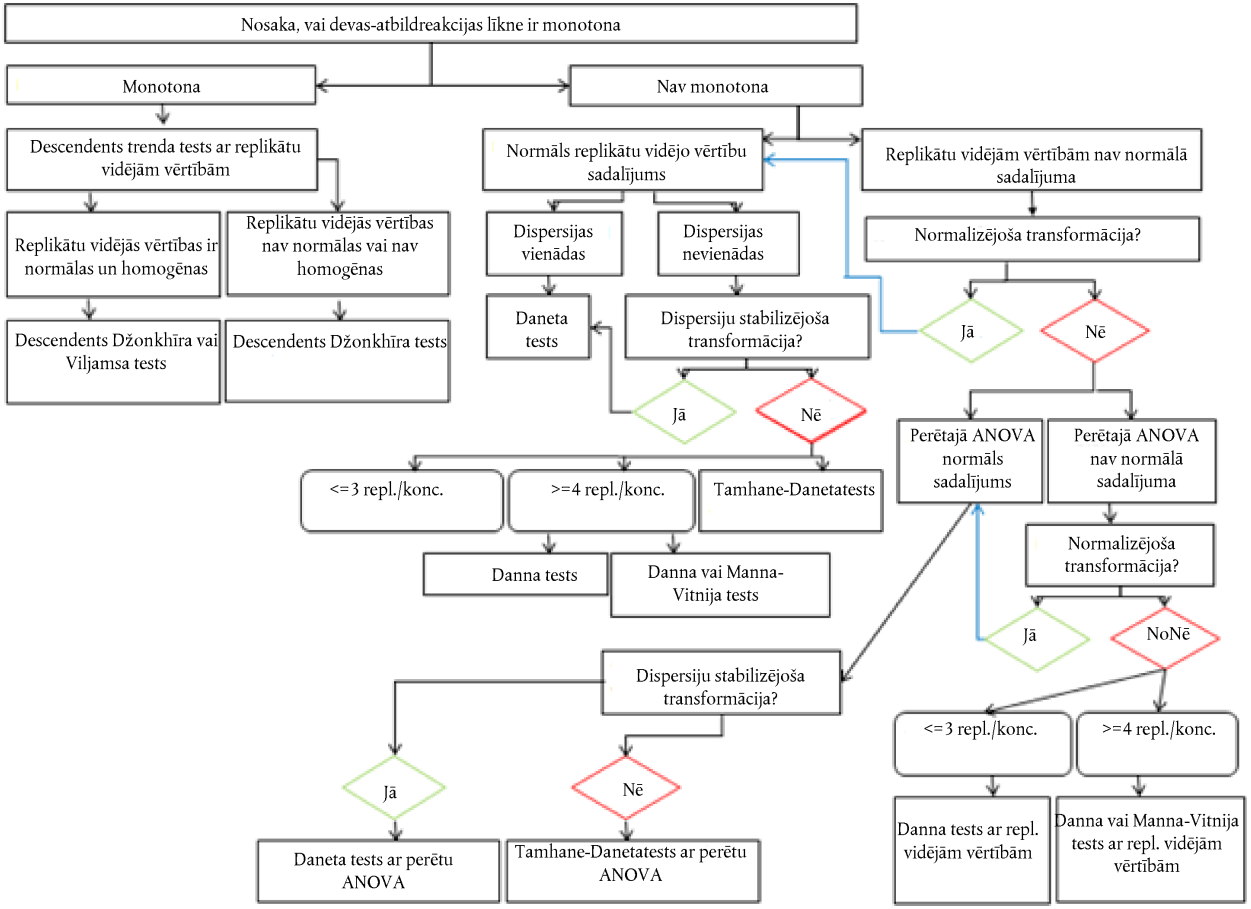
Stiprināto paraugu sagatavo, kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugam zināmā daudzumā pievienojot testiem kopīgo references standartvielu. Paraugu stiprina, lai VTG koncentrācija būtu 10 līdz 100 reizes lielāka nekā paredzamā vitelogenīna koncentrācija kontrolgrupas zivs tēviņa organismā. Kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugs, kuru stiprina, var būt no vienas zivs vai no vairākām zivīm.

Vismaz divās dublikātiedobēs analizē apakšparaugu ar nestiprinātu kontrolgrupas tēviņa plazmu. Vismaz divās dublikātiedobēs analizē arī stiprināto paraugu. Lai noteiktu sagaidāmo koncentrāciju, vitelogenīna vidējo daudzumu abos nestiprinātajos kontrolgrupas tēviņa plazmas paraugos pieskaita aprēķinātajam VTG daudzumam, kas pievienots paraugu stiprināšanai. Šo sagaidāmās koncentrācijas un izmērītās koncentrācijas attiecību kopā ar katra attiecīgajā dienā veiktā testa rezultātiem norāda testēšanas ziņojumā.

▼M7

8. papildinājums

PIEEJAS ORIENTĒJOŠU BCF APLĒŠANAI NO DATIEM, KAS IEGŪTI BARĪBEKSPOZĪCIJAS PĒTĪJUMĀ



▼M7

C.49. ZIVJU EMBRIJU AKŪTĀ TOKSISKUMA (*FET*) TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 236 (2013. gads). Tajā aprakstīts zivju embriju akūtā toksiskuma tests ar zebrzivi (*Danio rerio*). Šis tests ir paredzēts tam, lai noteiktu ķimikāliju akūto toksiskumu zivs embrionālās attīstības stadijās. Zivju embriju akūtā toksiskuma testa pamatā ir ar zebrzivi veiktie pētījumi un validēšanas darbības ((1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14)). Zivju embriju akūtā toksiskuma tests ir veiksmīgi izmantots dažādām ķimikālijām, kam ir dažādi iedarbības veidi, šķīdība, gaistamība un hidrofobiskums (aplūkoti 15. un 16. punktā).

2. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

3. Tikko apaugļotus zebrzivs ikrus eksponē testējamai ķimikālijai uz 96 stundām. Ik pēc 24 stundām kā letalitātes rādītājus reģistrē līdz četriem apikālo beigupunktu novērojumiem (6): i) apaugļotie ikri koagulējas, ii) neveidojas somīti, iii) astes dīglis neatdalās no dzeltenuma maisiņa, un iv) nav sirdsdarbības. Beidzoties ekspozīcijas periodam, akūto toksiskumu nosaka, pamatojoties uz pozitīvu iznākumu jebkurā no četriem reģistrētajiem apikālo beigupunktu novērojumiem, un aprēķina LC_{50}.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

4. Noderīga informācija par vielas specifiskajām īpašībām ir tās struktūrformula, molekulmasa, tīrība, noturība ūdenī un gaismā, pK_a un K_{ow}, šķīdība ūdenī un tās tvaika spiediens, kā arī bionoārdāmības tests (TM C.4. (17) vai TM C.29. (18)) rezultāti. Šķīdību un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai var rasties testējamās vielas zudumi iztvaikošanas dēļ. Vajadzētu būt, ka vielas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama uzticama analītiska metode ar pārbaudītu precizitāti un noteikšanas robežu.

5. Ja šo testēšanas metodi izmanto, lai testētu maisījumu, iespējami jāraksturo tā sastāvs, piemēram, jānorāda tā komponentu ķīmiskā identitāte, komponentu kvantitatīvais sastopamības biežums un komponentvielu specifiskās īpašības (sk. 4. punktu). Pirms izmantot testēšanas metodi, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.

6. Attiecībā uz vielām, kas var aktivizēties metabolisma ceļā, ir pierādījumi, ka zebrzivs embriji ir spējīgi uz biotransformēšanu (19), (20), (21), (22). Tomēr zivs embriju vielmaiņas jauda ne vienmēr ir līdzvērtīga zivs mazuļu vai pieaugušu zivju jaudai. Piemēram, *FET* testā nav novērota reakcija uz toksiskas vielas prekursoru alilspirtu (9). Tāpēc, ja ir kādas liecības, ka metabolīti vai citi nozīmīgi transformācijas produkti var būt vairāk toksiski nekā izejvielu savienojums, ir ieteicams veikt testu arī ar šo metabolītu/transformācijas produktu un secinājumus par testējamās ķimikālijas toksiskumu izdarīt, ņemot vērā arī šos rezultātus, vai arī veikt citu testu, kurā turpmāk ņem vērā vielmaiņu.

7. Nav paredzams, ka embriji būs jutīgi pret vielām ar molekulmasu ≥ 3kDa, ar lielgabarīta molekulāro struktūru vai vielām, kas kavē izšķilšanos un tādējādi var likvidēt vai samazināt pēcizšķilšanās ekspozīciju, jo šādu vielu biopieejamība ir ierobežota, tādēļ piemērotāki varētu būt citi toksiskuma testi.

▼M7

TESTA DERĪGUMS

8. Lai testa rezultāti būtu derīgi, piemēro šādus kritērijus:

a) Visu savākto ikru kopējam apaugļošanās rādītājam testētajās partijās jābūt ≥ 70 %.

b) Testa kamerās visu testa laiku jāuztur ūdens temperatūra 26 ± 1°C.

c) Kopējai embriju izdzīvotībai negatīvajā (atšķaidīšanas ūdens) kontrolē un, ja tāda vajadzīga, šķīduma kontrolē līdz 96 h ekspozīcijas beigām jābūt ≥ 90 %.

d) Ekspozīcijai pozitīvajā kontrolē (piemēram, zebrzivij 4,0 mg/l 3,4-dihloranilīna) 96 h ekspozīcijas beigās jārada minimāla mirstība 30 %.

e) Izšķilšanās rādītājam negatīvajā kontrolē (un šķīdinātāja kontrolē, ja tāda vajadzīga) 96 h ekspozīcijas beigās jābūt ≥ 80 %.

f) Izšķīdušā skābekļa koncentrācijai negatīvajā kontrolē un augstākajā testējamajā koncentrācijā 96 h ekspozīcijas beigās jābūt ≥ 80 % no piesātinājuma.

METODES APRAKSTS

9. Pārskats par ieteicamajiem turēšanas un testa apstākļiem ir pieejams 2. papildinājumā.

Aprīkojums

10. Ir nepieciešams šāds aprīkojums:

a) Akvāriji no ķīmiski inerta materiāla (piemēram, stikla) ar piemērotu ietilpību attiecībā pret ieteicamo noslogojumu (sk. "Zivju pēcnācēju turēšana", 14. punkts).

b) Mikroskops ar apgrieztu objektīva attēlu un/vai binokulāra ierīce ar vismaz 80 reižu palielinājumu. Ja novērojumu reģistrēšanas telpā temperatūru nevar noregulēt uz 26 ± 1°C, ir nepieciešama pārvietojama instrumentu platforma ar regulējamu temperatūru vai citi temperatūras uzturēšanas paņēmieni.

c) Testa kameras; piemēram, standartplates ar 24 iedobumiem, kuru dziļums ir apmēram 20 mm (sk. "Testa kameras", 11. punkts).

d) Piemēram, pašlīmējošās plēves, ar ko apsegt 24 iedobumu plates.

e) Ar kondicionētu gaisu un kontrolētu temperatūru aprīkots inkubators vai telpa, kurā iedobumos (vai testa kamerās) iespējams uzturēt temperatūru 26 ±1 °C.

f) pH mērīšanas aparāts.

g) Skābekļa mērītājs (oksimetrs).

h) Aprīkojums ūdens cietības un vadītspējas noteikšanai.

i) Nārstošanas paplāte: instrumentu paplātes no stikla, nerūsošā tērauda vai cita inerta materiāla; stiepļu sietiņš (acs 2 ± 0.5 mm) no nerūsošā tērauda vai cita inerta materiāla, kas aizsargātu nērstos ikrus; nārstošanas substrāts (piem., augu imitācijas no inerta materiāla) (TM C.48, 4.a papildinājums (23));

j) Ikru savākšanas pipetes ar paplašinātām atverēm.

▼M7

k) Stikla trauki, kur sagatavot dažādas testējamās koncentrācijas un atšķaidīšanas ūdeni (vārglāzes, mērkolbas, mērcilindri un mērpipetes) vai ievākt zebrzivs ikrus (piemēram, mērglāzes, kristalizācijas trauki).

l) Ja testa veikšanai izmanto alternatīvas ekspozīcijas sistēmas, piemēram, caurplūdi (24) vai pasīvo dozēšanu (25), ir nepieciešamas attiecīgas telpas un iekārtas.

Testa kameras

11. Izmanto stikla vai polistirola testa kameras (piemēram, 24 iedobumu plates ar 2,5-5 ml iepildes tilpumu katrā iedobumā). Ja ir aizdomas par adsorbēšanos uz polistirola (piemēram, nepolarizētas, planāras vielas ar augstu K_{OW}), jāizmanto inerti materiāli (stikls), lai samazinātu adsorbcijas radītos zudumus (26). Testa kameras inkubatorā jāizvieto randomizēti.

Ūdens un testa nosacījumi

12. Turēšanas ūdeni ieteicams atšķaidīt, lai panāktu dažādiem virszemes ūdeņiem raksturīgo cietības līmeni. Atšķaidīšanas ūdeni sagatavo no rekonstituēta ūdens (27). Galīgajai cietības pakāpei jābūt līdzvērtīgai 100-300 mg/l $CaCO_3$, lai pārmērīgi nenogulsnētos kalcija karbonāts. Var izmantot arī avota ūdenim līdzvērtīgu virszemes ūdeni vai avota ūdeni. Rekonstituēto ūdeni var pielāgot turēšanas ūdenim ar zemu cietības līmeni, to atšķaidot ar dejonizētu ūdeni attiecībā 1:5 līdz minimālajam cietības līmenim 30-35 mg/l $CaCO_3$. Ūdeni piesātina ar skābekli pirms testējamās ķimikālijas pievienošanas. Visā testa laikā iedobumos jāuztur temperatūra 26°±1°C. Savukārt pH līmenim jābūt starp pH 6,5 un 8,5, un testa laikā tas šajās robežās nedrīkst mainīties par vairāk nekā 1,5 vienībām. Ja nav sagaidāms, ka pH saglabāsies šajās robežās, pH jākoriģē pirms testa sākšanas. pH jākoriģē tā, lai izejšķīduma koncentrācija būtiski nemainītos un netiktu izraisīta nekāda testējamās ķimikālijas ķīmiska reakcija vai izgulsnēšanās. pH līmeni šķīdumos, kas satur testējamo ķimikāliju, ieteicams koriģēt ar ūdeņraža hlorīdu (HCl) un nātrija hidroksīdu (NaOH).

Testa šķīdumi

13. Testa šķīdumus izvēlētajās koncentrācijās var pagatavot, piemēram, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumus vēlams pagatavot, testējamo ķimikāliju vienkārši sajaucot vai kratot atšķaidīšanas ūdenī ar mehāniskiem līdzekļiem (piemēram, maisot un/vai izmantojot ultraskaņu). Ja testējamā ķimikālija slikti šķīst ūdenī, jāievēro procedūras, kas aprakstītas ESAO Testēšanas norādījumos Nr. 23 par apiešanos ar sarežģītām vielām un maisījumiem (28). Jāvairās lietot šķīdinātājus, bet dažos gadījumos tie var būt nepieciešami, lai iegūtu piemērotas koncentrācijas izejšķīdumu. Ja šķīdinātājs tiek izmantots izejšķīduma pagatavošanā, tā galīgā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 µl/l un visos testa traukos tai jābūt vienādai. Ja izmanto šķīdinātāju, ir nepieciešama šķīdinātāja papildu kontrole.

Zivju pēcnācēju turēšana

14. Ikru iegūšanai izmanto neeksponētas ikru veidošanai paredzētas savvaļas zebrzivis ar labi dokumentētu ikru apaugļošanās rādītāju. Zivīm jābūt bez makroskopiski atpazīstamiem infekcijas un citu slimību simptomiem un 2 mēnešus pirms nārsta tām nedrīkst būt veikta farmakoloģiska (akūta vai profilaktiska) ārstēšana. Vairošanai paredzētās zivis tur akvārijos ar ieteicamo ietilpību 1 l ūdens uz zivi un fiksētu 12–16 stundu fotoperiodu (29),

▼M7

(30), (31), (32), (33). Jākoriģē optimālais filtrēšanas ātrums; nedrīkst pieļaut pārmērīgu filtrēšanas ātrumu, kas izraisa spēcīgu ūdens perturbāciju. Informāciju par barošanas režīmu sk. 2. papildinājumā. Nav ieteicams, ka rodas barības pārpalikumi, turklāt akvārijā regulāri jāuzrauga ūdens kvalitāte un tīrība un, ja vajadzīgs, tā jāatjauno sākotnējā stāvoklī.

Kompetences pārbaude

15. Lai kontrolētu testēšanā izmantoto zivju pasugas jutīgumu, standartvielu 3,4-dihloranilīnu (izmanto validēšanas pētījumos (1) (2)) testē pilnā koncentrācijas–atbildreakcijas diapazonā, vēlams divreiz gadā. Šī standartķimikālija jāizmanto jebkurai laboratorijai, kas sāk veikt šo testu. Pirms jebkura laboratorija iesniedz datus regulatīviem mērķiem, tā var ar šīs ķimikālijas palīdzību pierādīt savu tehnisko kompetenci šā testa veikšanā.

Ikru iegūšana

16. Zebrzivs ikrus var iegūt, izmantojot nārsta grupas (atsevišķās nārstošanas tvertnēs) vai izmantojot masveida nārstu (zivju turēšanas tvertnēs). Nārsta grupās katras vairošanās grupas zivju tēviņus un mātītes (piemēram, attiecībā 2:1) nārstošanas tvertnēs ievieto pirmstesta dienā dažas stundas pirms tumsas iestāšanās. Tā kā nārsta grupas zebrzivīm reizēm nārsts var neizdoties, ieteicams paralēli izmantot vismaz trīs nārsta tvertnes. Lai nerastos ģenētiskas cilmes novirzes, ikrus ievāc no vismaz trim vairošanās grupām, sajauc un izraugās randomizēti.

17. Lai ievāktu ikrus, nārsta krātiņus zivju nārstošanas vai turēšanas tvertnēs ievieto pirmstesta dienā pirms tumsas iestāšanās vai testa dienā pirms gaismas iestāšanās. Lai pieaugušās zebrzivis ikrus neapēstu, nārsta krātiņus pārklāj ar inerta materiāla režģi ar attiecīgu aci (apmēram 2 ± 0,5 mm). Ja uzskata par vajadzīgu, pie tīkla kā nārstošanas veicinātājus var piestiprināt no inerta materiāla (piemēram, plastmasas vai stikla) izgatavotus mākslīgos augus (3), (4), (5), (23), (35). Jāizmanto rūdītas plastmasas materiāli, no kuriem neizdalās vielas (piem., ftalāti). Pārošanās, nārsts un apaugļošanās notiek 30 minūšu laikā pēc gaismas iestāšanās, un tad nārsta krātiņus ar ievāktajiem ikriem var uzmanīgi izņemt. Kad ikri ievākti no nārsta krātiņiem, ieteicams tos skalot ar rekonstituētu ūdeni.

Ikru diferenciācija

18. 26°C temperatūrā apaugļoti ikri pirmoreiz dalās apmēram pēc 15 minūtēm, un sinhronās dalīšanās procesā, kas notiek pēc tam, veidojas 4, 8, 16 un 32 šūnu blastomēri (sk. 3. papildinājumu) (35). Šajās stadijās apaugļotos ikrus var skaidri identificēt, novērojot blastulas attīstību.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas nosacījumi

19. Testējamai ķimikālijai eksponē divdesmit embrijus uz katru koncentrāciju (viens embrijs uz iedobi). Ekspozīcijai jābūt tādai, lai visā testa laikā par ±20 % saglabātos nominālā ķimikālijas koncentrācija. Ja statiskā sistēmā tas nav iespējams, ir jāizmanto praktiski pielietojams pusstatisks atjaunošanas intervāls (piem., atjaunošana ik pēc 24 stundām). Šajos gadījumos ekspozīcijas koncentrācijas vismaz augstākajā un zemākajā testējamās koncentrācijas kategorijā jāverificē katra ekspozīcijas intervāla sākumā un beigās (sk. 36. punktu). Ja ekspozīcijas koncentrāciju nevar uzturēt ±20 % apjomā no

▼M7

nominālās koncentrācijas, visas koncentrācijas katra ekspozīcijas intervāla sākumā un beigās ir jāmēra (sk. 36. punktu). Pēc atjaunošanas jāgādā, ka embrijus no izžūšanas joprojām sargā neliels daudzums veco testa šķīdumu. Testa plānu var koriģēt, lai būtu apmierinātas konkrētu vielu testēšanas prasības (piem., viegli noārdāmām vai stipri adsorbtīvām vielām (29) izmantojot caurplūdes (24) vai pasīvās dozēšanas sistēmas (25), vai gaistošām vielām (36) (37) citas sistēmas). Jebkurā gadījumā jāraugās, lai stresu embrijiem samazinātu līdz minimumam. Pirms testa sākšanas testa kameras vismaz 24 stundas ilgi jākondicionē ar testējamiem šķīdumiem. Testa nosacījumi ir apkopoti 2. papildinājumā.

Testējamās koncentrācijas

20. Atbilstību statistikas prasībām parasti var nodrošināt, ja ir piecas testējamās vielas koncentrācijas, ko citu no citas šķir konstants koeficients, kurš nepārsniedz 2,2. Ja izmanto mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Vēlams, lai augstākā testētā koncentrācija izraisītu 100 % letalitāti (definēta 28. punktā) un lai zemākā testētā koncentrācija neizraisītu nekādu novērojamu ietekmi. Attiecīgo koncentrāciju diapazonu var izraudzīties, pirms izšķirīgā testa veicot devu diapazona noteikšanas testu. Devu diapazonu parasti nosaka, uz vienu koncentrāciju izmantojot desmit embrijus. Turpmākie norādījumi attiecas uz testa veikšanu ar 24 iedobumu platēm. Ja izmanto atšķirīgus testa traukus (piem., mazas Petri plates) vai testē vairāk koncentrāciju, norādījumi attiecīgi jākoriģē.

21. Detalizēta informācija un vizuāli norādījumi par koncentrāciju sadalījumu 24 iedobumu platēs ir pieejami 27. punktā un 4. papildinājuma 1. zīmējumā.

Kontroles

22. Atšķaidīšanas ūdens kontroles ir nepieciešamas gan kā negatīva kontrole, gan kā plašu iekšējās kontroles. Ja iekšējā plates kontrolē novēro vairāk nekā vienu nedzīvu embriju, plati atmet, tādējādi samazinot LC_{50} atvasināšanai izmantoto koncentrāciju skaitu. Ja atmet visu plati, novērotās ietekmes izvērtēt un izšķirt var kļūt daudz grūtāk, it īpaši, ja nederīgā plate ir šķīdinātāja kontroles plate vai plate, kurā ir arī apstrādāti embriji. Pirmajā gadījumā tests ir jāatkārto. Otrajā gadījumā sakarā ar to, ka iekšējā kontrolē novērotas mirstības dēļ zaudēta vesela apstrādes grupa vai grupas, spēja izvērtēt ietekmi un noteikt LC_{50} vērtības var samazināties.

23. Ar katru testēšanai izmantoto ikru partiju izdara pozitīvu kontroli ar fiksētu koncentrāciju — 4 mg/l 3,4-dihloranilīna.

24. Ja izmanto šķīdinātāju, šķīdinātājam atsevišķā 24 iedobumu platē eksponē papildu grupu ar 20 embrijiem, proti, izmanto par šķīdinātāja kontroli. Lai tests būtu uzskatāms par pieņemamu, būtu jāpierāda, ka šķīdinātājam nav nekādas būtiskas ietekmes uz izšķilšanās rādītāju vai izdzīvotību un nekādas citādas kaitīgas ietekmes uz embrijiem (sal. ar 8.c punktu).

Ekspozīcijas sākšana un testa ilgums

25. Testu uzsāk iespējami drīz pēc ikru apaugļošanās un izbeidz pēc 96 h ekspozīcijas. Embriji testa šķīdumos jāiegremdē, pirms sāk dalīties blastodisks vai vēlākais līdz 16 šūnu stadijai. Lai ekspozīcijas sākšana būtu kavēta minimāli, randomizēti atlasa ikrus tādā daudzumā, kas vismaz divreiz pārsniedz katrai apstrādes grupai vajadzīgo daudzumu, un ne vēlāk kā 90 minūtes pēc apaugļošanās ievieto attiecīgajās koncentrācijās un kontrolēs (piemēram, 100 ml kristalizācijas traukos; ikriem jābūt pilnībā nosegtiem).

26. Dzīvotspējīgi apaugļoti ikri jāatdala no neapaugļotiem ikriem un 180 minūšu laikā pēc apaugļošanās jāievieto 24 iedobumu platēs, kas iepriekš kondicionētas 24 stundas un piepildītas ar 2 ml svaigi pagatavota testējamā šķīduma uz iedobumu. Ar stereomikroskopu (vēlams ≥30 reižu palielinājums) atlasa

▼M7

apaugļotos ikrus, kuriem vērojama dalīšanās un dalīšanās laikā nav acīm redzamas novirzes (piemēram, asimetrija, vezikulas veidošanās) vai traumēts horijs. Par ikru savākšanu un atlasi sk. 3. papildinājuma 1. un 3. attēlu un 4. papildinājuma 2. attēlu.

Ikru sadalījums pa 24 iedobumu platēm

27. Ikri tiek sadalīti pa iedobumu platēm šādā skaitā (sk. arī 4. papildinājuma 1. attēlu).

— 20 ikri vienā platē katrai testējamajai koncentrācijai;

— 20 ikri šķīdinātāja kontrolē uz vienas plates (ja vajadzīgs);

— 20 ikri kā pozitīvā kontrole uz vienas plates;

— 4 ikri atšķaidīšanas ūdenī kā iekšējā plates kontrole katrā no iepriekš minētajām platēm;

— 24 ikri atšķaidīšanas ūdenī kā negatīvā kontrole uz vienas plates.

Novērojumi

28. Katram embrijam veiktie apikālo beigupunktu novērojumi ir: embriju koagulēšanās, somītu neveidošanās, astes neatdalīšanās un sirdsdarbības neesība (1. tabula). Šie novērojumi tiek izmantoti, lai noteiktu mirstību: pozitīvs rezultāts jebkurā no šiem novērojumiem nozīmē, ka zebrzivs embrijs ir nedzīvs. Turklāt testējamās grupās un kontrolgrupās katru dienu, sākot no 48 h, reģistrē izšķilšanos. Novērojumus reģistrē ik pēc 24 h līdz testa pabeigšanai.

1. tabula

Zebrzivs embriju akūtā toksiskuma apikālo beigupunktu novērojumi 24–96 h pēc apaugļošanās

	Ekspozīcijas laiks			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Koagulējušies embriji	+	+	+	+
Neveidojas somīti	+	+	+	+
Neatdalās aste	+	+	+	+
Neesoša sirdsdarbība		+	+	+

29. *Embriju koagulēšanās.* Koagulējušies embriji ir pienbalti un mikroskopā izskatās tumši (sk. 5. papildinājuma 1. att.). Koagulējušos embriju skaitu nosaka pēc 24, 48, 72 un 96 h.

30. *Neveidojas somīti.* Normāli attīstītam zebrzivs embrijam 26 ± 1°C temperatūrā pēc 24 stundām izveidojas apmēram 20 somītu (sk. 5. papildinājuma 2. att.). Normāli attīstītam embrijam vērojamas spontānas kustības (sānvirziena kontrakcijas). Spontānas kustības liecina par somītu veidošanos. Somītu trūkumu reģistrē pēc 24, 48, 72 un 96 h. Somītu neveidošanās pēc 24 h varētu būt saistīta ar vispārīgu attīstības atpalicību. Somītu veidošanās procesam jāsākas vēlākais pēc 48 stundām. Ja tie neveidojas, embrijus uzskata par nedzīviem.

31. *Neatdalās aste.* Normāli attīstītam zebrzivs embrijam astes atdalīšanos (sk. 5. papildinājuma 3. att.) no dzeltenuma novēro pēc tam, kad pagarinājusies

▼M7

embrija ķermeņa mugurdaļa. Astes neatdalīšanos reģistrē pēc 24, 48, 72 un 96 h.

32. *Sirdsdarbības neesība.* Normāli attīstītam zebrzivs embrijam 26 ± 1°C temperatūrā pēc 48 stundām ir novērojama sirdsdarbība (sk. 5. papildinājuma 4. attēlu). Reģistrējot šo beigupunktu, jāievēro īpaša piesardzība, jo neregulāra (neparasta) sirdsdarbība *nav* jāreģistrē kā letāls iznākums. Turklāt par letālu netiek uzskatīta redzama sirdsdarbība bez asinsrites *aortas abdominalis*. Lai reģistrētu šo beigupunktu, embriji, kas neuzrāda nekādas sirdsdarbības pazīmes, izmantojot minimālo palielinājumu 80x, jānovēro vismaz vienu minūti. Sirdsdarbības neesību reģistrē pēc 48, 72 un 96 h.

33. Visās testa un kontroles grupās jāreģistrē izšķilšanās rādītājs un tas ziņojumā jāatspoguļo pēc 48 stundām un pēc tam. Izšķilšanās gan nav kritērijs, ko izmanto, lai aprēķinātu LC_{50}, taču tā nozīmē, ka embrijs tiek eksponēts bez horija kavējošās ietekmes, un tādējādi var palīdzēt datu interpretācijā.

34. Zebrzivs embrija normālas attīstības (35) un patoloģiskas attīstības piemēri ir sīki aprakstīti 3. un 5. papildinājumā.

Analītiskie mērījumi

35. Testa sākumā un beigās kontrolē(-s) un augstākajā testējamās ķimikālijas koncentrācijā mēra pH līmeni, vispārējo cietību un vadītspēju. Pusstatiskās atjaunošanas sistēmās pH jāmēra gan pirms, gan pēc ūdens atjaunošanas. Izšķīdušā skābekļa koncentrāciju mēra testa beigās negatīvajās kontrolēs un augstākajā testējamajā koncentrācijā ar dzīvotspējīgiem embrijiem, un tai jāatbilst testa derīguma kritērijiem (sk. 8.f punktu). Ja ir bažas, ka temperatūra 24 iedobumu platēs svārstās, temperatūru mēra trīs randomizēti izraudzītos traukos. Temperatūru testa laikā vēlams reģistrēt nepārtraukti vai vismaz katru dienu.

36. Statiskā sistēmā testējamās vielas koncentrāciju mēra vismaz augstākajā un zemākajā testējamajā koncentrācijā, bet vēlams visās apstrādes grupās testa sākumā un beigās. Pusstatiskajos (atjaunošanas) testos, kuros sagaidāms, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija saglabāsies ± 20 % robežās no nominālajām vērtībām, ir ieteicams analizēt vismaz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju, kas pagatavota tieši pirms atjaunošanas. Testos, kuros sagaidāms, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija nesaglabāsies ± 20 % robežās no nominālās vērtības, ir jāanalizē visas testējamās koncentrācijas, kas pagatavotas tieši pirms atjaunošanas. Ja apjoms ir analīzei nepietiekams, var būt lietderīgi apvienot testa šķīdumus vai izmantot aizstājējkameras, kas izgatavotas no tā paša materiāla un kurām ir tāds pats tilpums attiecībā pret virsmas laukuma rādītājiem kā 24 iedobumu platēm. Ir ļoti ieteicams rezultātus pamatot ar izmērītajām koncentrācijām. Ja nesaglabājas koncentrācija 80–120 % no nominālās koncentrācijas, ietekmi izraisošā koncentrācija jāizsaka attiecībā pret ģeometrisko vidējo izmērīto koncentrāciju; sīkāku informāciju sk. ESAO norādījumos par sarežģītu vielu un maisījumu toksiskuma testēšanu ūdenī (28).

ROBEŽTESTS

37. Izmantojot šajā testēšanas metodē aprakstītās procedūras, robežtestu var veikt ar testējamo ķimikāliju koncentrācijā 100 mg/l vai ar koncentrāciju pie tās šķīdības robežas testa barotnē (atkarībā no tā, kurš no šiem rādītājiem ir zemāks), lai pierādītu, ka LC_{50} pārsniedz šo koncentrāciju. Robežtests jāveic, izmantojot 20 apstrādes embrijus, pozitīvo kontroli un, ja vajadzīgs,

▼M7

šķīdinātāja kontroli un 24 embriju negatīvo kontroli. Ja testējamai koncentrācijai letalitātes procents par 10 % pārsniedz mirstību negatīvajā kontrolē (vai šķīdinātāja kontrolē), pētījums jāveic pilnībā. Jāreģistrē jebkāda novērota ietekme. Ja mirstība negatīvajā kontrolē (vai šķīdinātāja kontrolē) pārsniedz 10 %, tests kļūst nederīgs un ir jāatkārto.

DATI UN ZIŅOŠANA

Rezultātu apstrāde

38. Šajā testā atsevišķie iedobumi tiek uzskatīti par statistiskās analīzes neatkarīgiem replikātiem. Tādu embriju procentuālos daudzumus, attiecībā uz kuriem 48 stundās un/vai 96 stundās ir pozitīvs vismaz viens no apikālo beigupunktu novērojumiem, atspoguļo grafiski atbilstoši testējamajām koncentrācijām. Lai aprēķinātu līknes virziena koeficientus, LC_{50} vērtības un ticamības robežas (95 %), jāizmanto attiecīgas statistikas metodes (38) un *OECD Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (39).

Testēšanas pārskats

39. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju:

Testējamā ķimikālija:

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identitāte, piemēram, IUPAC vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte attiecīgā gadījumā un, ja praktiski iespējams, u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Vairākkomponentu viela, *UVCB* vielas un maisījumi:

— tiek iespējami izsmeļoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa organismi:

— zinātniskais nosaukums, pasuga, izcelsmes avots un apaugļotu ikru savākšanas metode un turpmāka apstrāde.

Testa nosacījumi:

— izmantotā testa procedūra (piemēram, pusstatiska atjaunošana);

— gaismas periods;

— testa plāns (piemēram, testa kameru skaits, kontroles veidi);

— ūdens kvalitātes īpašības zivju turēšanai (piemēram, pH, cietība, temperatūra, elektrovadītspēja, izšķīdušais skābeklis);

— izšķīdušā skābekļa koncentrācija, pH, kopējā cietība, temperatūra un testējamo šķīdumu vadītspēja testa sākumā un pēc 96 h;

— izejšķīdumu un testa šķīdumu sagatavošanas metode, kā arī atjaunošanas biežums;

▼M7

— šķīdinātāja izmantošanas pamatojums un šķīdinātāja izvēles pamatojums, ja tas nav ūdens;

— nominālās testējamās koncentrācijas un visu to analīžu rezultāti, ar kurām noteiktas testējamās ķimikālijas koncentrāciju testa traukos; ziņojumā jāatspoguļo arī metodei piemītošā atgūstamība un kvantitatīvās noteikšanas robeža (*LoQ*);

— pierādījumi, ka kontroles atbildušas vispārējiem izdzīvotības derīguma kritērijiem;

— ikru apaugļošanās rādītājs;

— izšķilšanās rādītājs apstrādes un kontroles grupās.

Rezultāti:

— maksimālā koncentrācija, kas testa laikā neizraisa mirstību;

— minimālā koncentrācija, kas testa laikā izraisa 100 % mirstību;

— ieteiktajā novērošanas laikā kumulatīvā mirstība katrā koncentrācijā;

— LC_{50} vērtības pēc 96 h (un fakultatīvi pēc 48 h) attiecībā uz mirstību ar 95 % ticamības robežu, ja iespējams;

— koncentrācijas un mirstības līknes diagramma testa beigās;

— mirstība kontrolēs (negatīvajās kontrolēs, iekšējās plašu kontrolēs, kā arī izmantotajā pozitīvajā kontrolē un šķīdinātāja kontrolē);

— rezultātu dati par katru no četriem apikālā beigupunkta novērojumiem;

— morfoloģisko un fizioloģisko anomāliju biežums un apraksts, ja tādas novērotas (sk. piemērus 5. papildinājuma 2. attēlā);

— tādi incidenti testa gaitā, kas varējuši ietekmēt rezultātus;

— datu statistiskā analīze un apstrāde (probita analīze, loģistiskās regresijas modelis un vidējais ģeometriskais attiecībā uz LC_{50});

— (pārveidota) koncentrācijas–atbildreakcijas regresijas līknes virziena koeficienti un ticamības robežas.

Jebkura novirze no testēšanas metodes un attiecīgi skaidrojumi.

Apspriešana un rezultātu interpretācija.

LITERATŪRA

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: I un II daļa. *Series on Testing and Assessment No.* 157, *OECD, Paris*.

(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, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the

▼M7

acute fish 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) International Organization for Standardization.

(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. and 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*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and 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., 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. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and 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. and 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. *Bull. Environ.* Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and 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. and 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. and Carr G. J.. Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry (Accepted).

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., 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. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196209

(17) Šā pielikuma C.4. nodaļa: Ready Biodegradability.

(18) Šā pielikuma C.29. nodaļa: Ready Biodegradability, CO_2 in sealed vessels.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., 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., 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., 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. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Šā pielikuma C.48. nodaļa: Fish Short Term Reproduction Assay. Sk. 4.a papildinājumu.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., 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., 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., 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 Standards. 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. Pieejams: [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, Paris.

(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*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, 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) Eiropas Komisija (2007). Komisijas 2007. gada 18. jūnija Ieteikums 2007/526/EK par izvietošanas un aprūpes vadlīnijām attiecībā uz dzīvniekiem, kurus izmanto izmēģinājumos un citiem zinātniskiem mērķiem (izziņots ar dokumenta numuru C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) Eiropas Savienība (2010). Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību. (Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis L 276:33-79.) 20.10.2010.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:LV: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. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Šā pielikuma C.2. nodaļa: Daphnia sp., Acute Immobilistaion Test.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., 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. Pieejams: [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, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

1. papildinājums

DEFINICĪJAS

Apikālais beigupunkts ir ietekmes radīšana populācijas līmenī.

Blastula ir tāds šūnu veidojums ap dzīvnieka olšūnas kodolu, kas aptver noteiktu daļu no dzeltenuma.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Epibolija ir — galvenokārt epidermas šūnu — masveida vairošanās embrija gastrulācijas stadijā un no muguras uz vēdera pusi notiekoša to pārvietošanās, ar kuru endodermas šūnu slāņi tiek iekļauti invaginācijai līdzīgā procesā un dzeltenums tiek ietverts embrijā.

Caurplūdes tests ir tests ar testējamo šķīdumu nepārtrauktu plūsmu caur testa sistēmu visā ekspozīcijas laikā.

Iekšēja plates kontrole ir iekšējā kontrole, kas sastāv no 4 iedobumiem, kuri katrā 24 iedobumu platē piepildīti ar atšķaidīšanas ūdeni, un kas paredzēta, lai noteiktu potenciālo piesārņojumu, ko procedūras laikā radījis ražotājs vai pētnieks, un jebkādu plates iedarbību, kas var ietekmēt testa rezultātus (piemēram, temperatūras gradients).

IUPAC ir Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Turēšanas ūdens ir ūdens, kurā tur pieaugušas zivis.

Vidējā letālā koncentrācija (LC_{50}) ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas testa laikā tiek uzskatīta par letālu 50 % testa organismu.

Pusstatiskais atjaunošanas tests ir tests ar testa šķīdumu regulāru atjaunošanu pēc noteiktiem laika periodiem (piemēram, ik pēc 24 h).

SMILES ir Vienkāršotas molekulāro datu ievades lineāras izteiksmes sistēma.

Somīts jaunattīstītiem mugurkaulnieku embrijiem ir mezodermas slānis, kas klāj nervu caurulītes sienas un eventuāli attīstās par ādu (*dermatome*), skeleta muskuļiem (*myotome*) un skriemeļiem (*sclerotome*).

Statisks tests ir tests, kurā testa šķīdumus nemaina visā testa laikā.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, kuru testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB ir vielas ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

▼M7

2. papildinājums

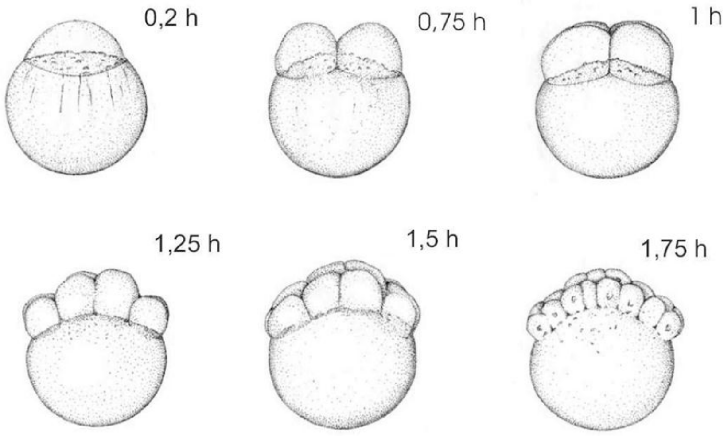
ZEBRZIVS TURĒŠANA, PAVAIROŠANA UN TIPISKI NOSACĪJUMI EMBRIJU AKŪTA TOKSISKUMA TESTIEM

		Zebrzivs (*Danio rerio*)
Sugas izcelsmes vieta		Indija, Birma, Melaka, Sumatra
Dzimumdimorfisms		Mātītes: izteikts vēders, kad tās iznēsā ikrus Tēviņi: tievāki, oranžs tonis zilas krāsas garenu svītru starpās (jo īpaši novērojams pie anālās spuras)
Barošanas režīms		Sausu pārslu barība (maks. 3 % no zivju svara dienā) 3–5 reizes dienā; papildus sālsūdens garneles (*Artemia s*.) un/vai no nepiesārņota avota iegūtas attiecīga lieluma mazas dafnijas. Barošana ar dzīvu barību bagātina vidi, tāpēc iespējami jābaro ar dzīvu barību. Lai nodrošinātu optimālu ūdens kvalitāti, apmēram vienu stundu pēc barošanas jāaizvāc liekā barība un fekālijas.
Pieaugušu zivju aptuvenais svars		Mātītes: 0,65 ±0,13 g Tēviņi: 0,5 ±0,1 g
Vecākzivju turēšana	Gaismas režīms	Dienasgaismas spuldzes (plaša spektra); 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1080 lux vai 50-100 ft-c (ambienti laboratorijas līmeņi); fotoperiods 12-16 h
	Ūdens temperatūra	26°±1 °C
	Ūdens kvalitāte	O_2 piesātinājums ≥80 %, cietība: piemēram, ~30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ un NO_2^-: < 0,001 mg/l, hlora atlikums < 10 µg/l, kopējais organiskais hlors < 25 ng/l, pH = 6,5-8,5
	Papildu ūdens kvalitātes kritēriji	Daļiņas < 20 mg/l, kopējais organiskais ogleklis < 2 mg/l, kopējais fosfororganisko pesticīdu daudzums < 50 ng/l, kopējais hlororganisko pesticīdu un polihlorēto bifenilu daudzums < 50 ng/l
	Zivju turēšanas tvertnes izmērs	piemēram, 180 l, 1 zivs uz litru
	Ūdens attīrīšana	Permanenta (ogles filtrēta); citas iespējas ir pusstatiskas atjaunošanas tehnisko uzturēšanu vai caurplūdes sistēmu kombinēt ar nepārtrauktu ūdens atjaunošanu
	Vairošanai ieteicamā tēviņu un mātīšu attiecība	2:1 (vai masveida nārsts)
Nārsta tvertnes		piemēram, 4 l tvertnes, aprīkotas ar tērauda režģa apakšu un augu imitācijām kā nārsta stimulētājiem; ārējās apsildes paklāji vai masveida nārstošana zivju turēšanas tvertnēs
Ikru struktūra un izskats		Stabils horijs (t. i., ļoti caurspīdīgs, bez lipīgas konsistences, ar diametru ~ 0,8–1,5 mm)
Nārstošanas intensitāte		Viena nobriedusi mātīte iznārsto vismaz 50-80 ikrus dienā. Atkarībā no pasugas nārstošanas intensitāte var būt krietni augstāka. Apaugļošanās rādītājam jābūt ≥70 %. Pirmo reizi nārstojošām zivīm pirmajos nārstos ikru apaugļošanās rādītājs var būt mazāks.
Testa veids		Statisks, pusstatiska atjaunošana, caurplūde, 26 ±1°C, 24 h kondicionētas testa kameras (piemēram, 24 iedobumu plates ar 2,5-5 ml uz dobumu).

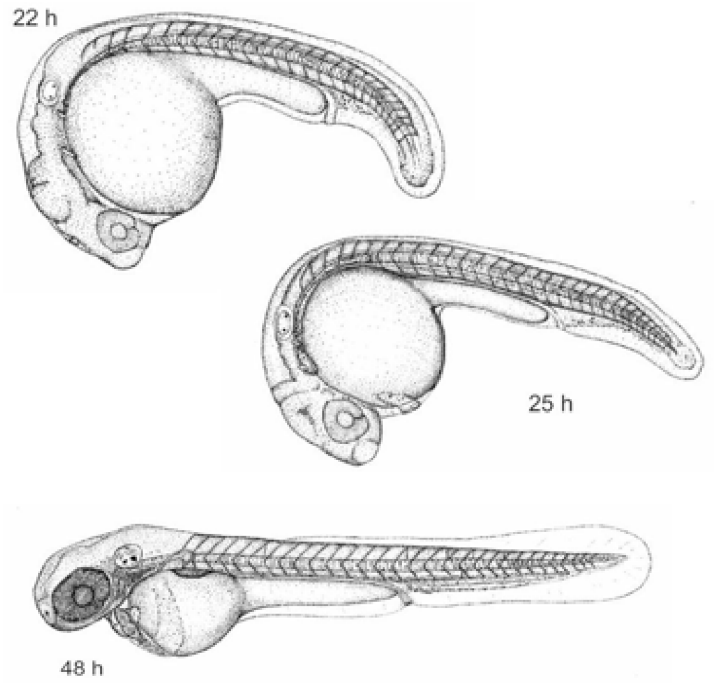
▼M7

3. papildinājums

NORMĀLA ZEBRZIVS ATTĪSTĪBA 26°C TEMPERATŪRĀ

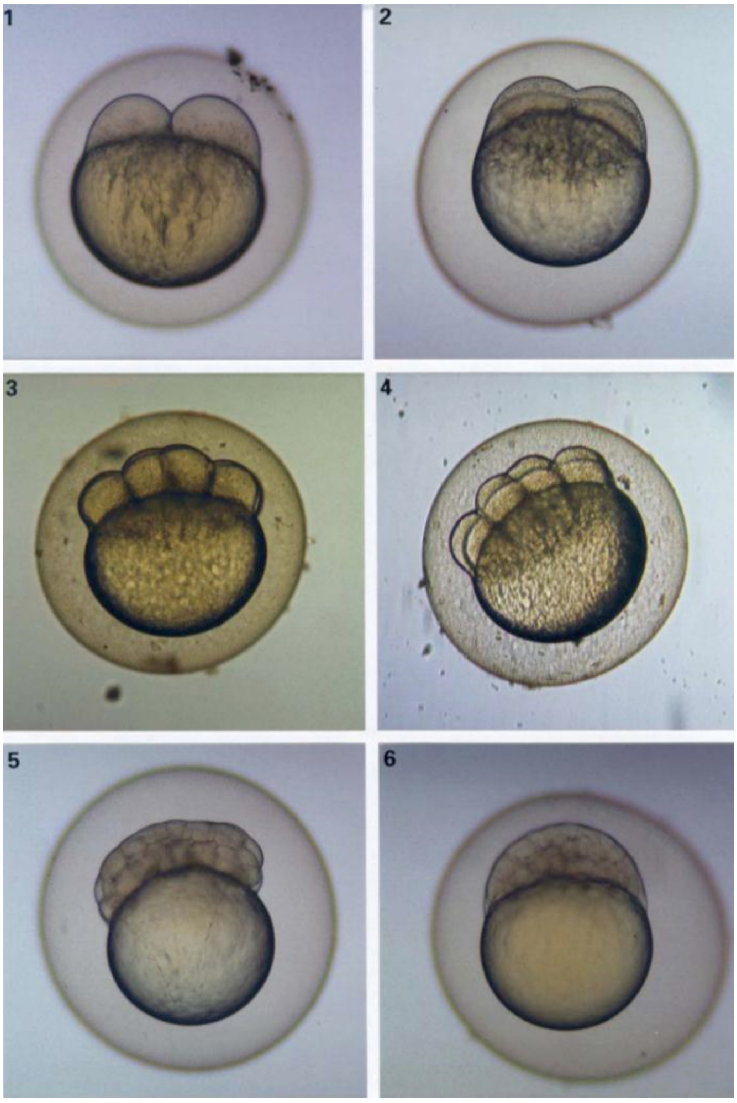


1. attēls. Daži zebrzivs (*Danio rerio*) agrīnās attīstības posmi: 0,2–1,75 h pēc apaugļošanās (Kimmel *et al*., 1995 (35)). Pēc normālattīstības laika grafika var diagnosticēt gan ikru apaugļošanos, gan to dzīvotspēju (sk. 26. punktu "Apaugļoto ikru atlase").



2. attēls. Izraudzītas ir zebrzivs (*Danio rerio*) vēlīnas attīstības stadijas (lai optimizētu redzamību, embrijam atdalīts horijs): 22–48 h pēc apaugļošanās (Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



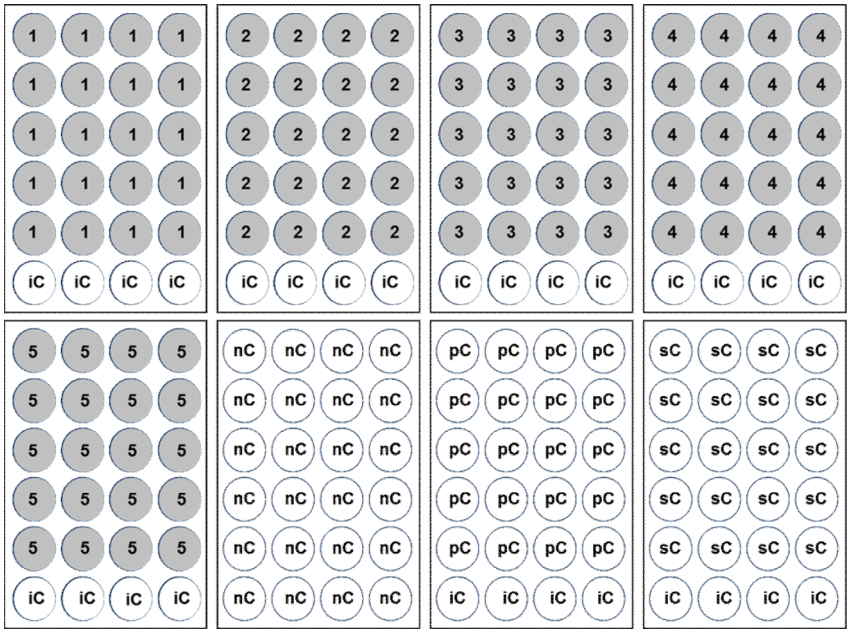
3. attēls. Zebrzivs (*Danio rerio*) embriju normāla attīstība: (1) 0,75 h, 2 šūnu stadija; (2) 1 h, 4 šūnu stadija; (3) 1,2 h, 8 šūnu stadija; (4) 1,5 h, 16 šūnu stadija; (5) 4,7 h, epibolijas sākums; (6) 5,3 h, apmēram 50 % epibolija (*Braunbeck & Lammer* 2006 (40)).

▼**M7**

4. papildinājums

1. attēls

24 iedobumu plašu izkārtojums



1-5 = piecas testējamās koncentrācijas /ķimikālija;

nC = negatīvā kontrole (atšķaidīšanas ūdens);

iC = iekšējā plates kontrole (atšķaidīšanas ūdens);

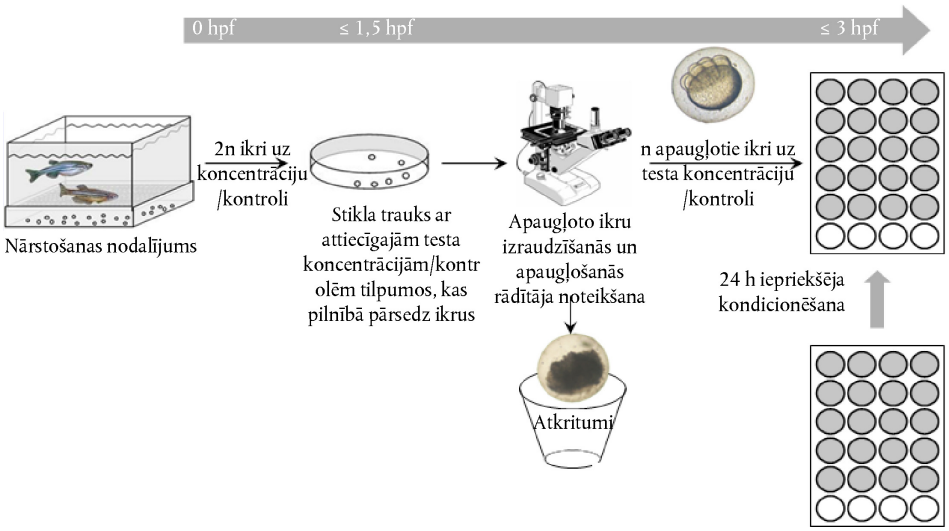
pC = pozitīvā kontrole (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = šķīdinātāja kontrole

▼M7

2. attēls

Zebrzivs embrija akūta toksiskuma testa procedūras shēma (no kreisās uz labo): ikru ražošana, ikru ievākšana, iepriekšēja ekspozīcija uzreiz pēc apaugļošanās stikla traukos, apaugļoto ikru izraudzīšanās, kurā izmanto mikroskopu ar apgrieztu objektīva attēlu vai binokulāru, un apaugļoto ikru sadale pa 24 iedobumu platēm, kurās sagatavotas attiecīgās testējamās koncentrācijas/kontroles, n = ikru skaits, kas nepieciešams katrai testējamajai koncentrācijai/kontrolei (šeit 20), hpf = stundas pēc apaugļošanās.



▼M7

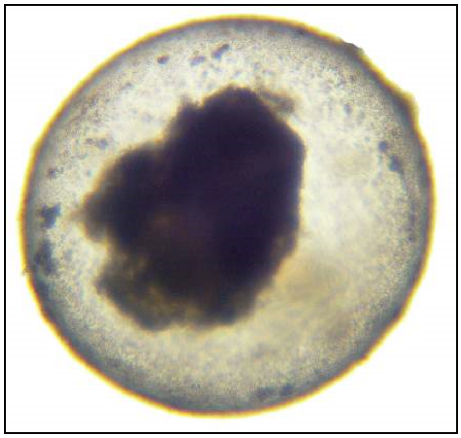
5. papildinājums

LETĀLU BEIGUPUNKTU ATLANTS ZEBRZIVS EMBRIJU AKŪTĀ TOKSISKUMA TESTAM

Par akūtu toksiskumu un līdz ar to par embriju nāvi liecina šādi apikālie beigupunkti: embrija koagulācija, astes neatdalīšanās, somītu neveidošanās un neesoša sirdsdarbība. Lai ilustrētu šos beigupunktus, tika atlasītas šādas mikrogrāfijas.

1. attēls

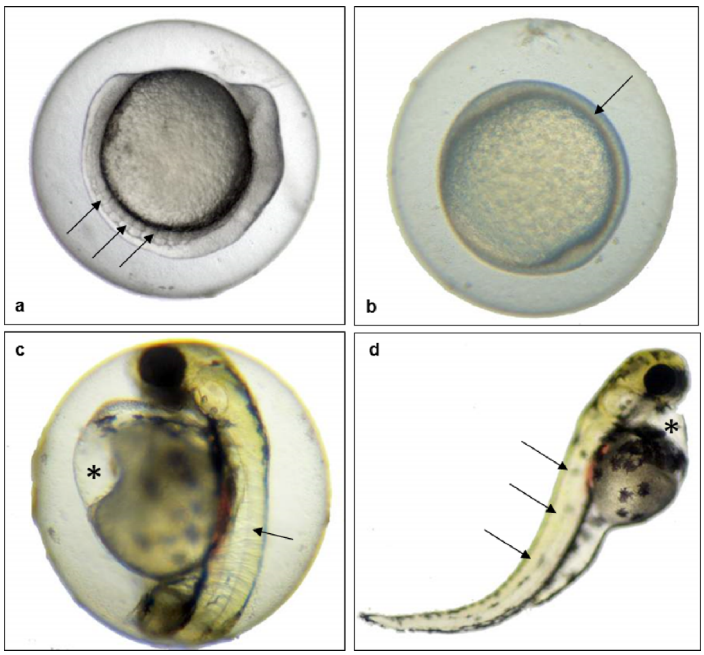
Embrija koagulēšanās.



Spilgtā lauka apgaismojumā koagulētos zebrzivs embrijos redzami iekļauti dažādi necaurskatāmi veidojumi.

2. attēls

Somītu neveidošanās

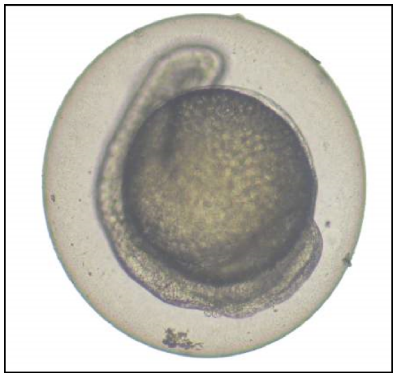


▼M7

Kaut apmēram par 10 h atpalicis attīstībā, 24 h vecs zebrzivs embrijs (a) uzrāda labi attīstītus somītus (→), bet embrijs (b) neuzrāda nekādas somītu veidošanās pazīmes (→). Lai gan konstatējama izteikta dzeltenuma maisiņa tūska (*), 48 h vecs zebrzivs embrijs (c) uzrāda skaidru somītu veidošanos (→), savukārt 96 h vecs zebras zivs embrijs, kas attēlots (d), neuzrāda nekādas somītu veidošanās pazīmes (→). Pievērsiet uzmanību arī mugurkaula izliekumam (skoliozei) un perikarda tūskai (*) embrijam, kas parādīts (d).

3. attēls

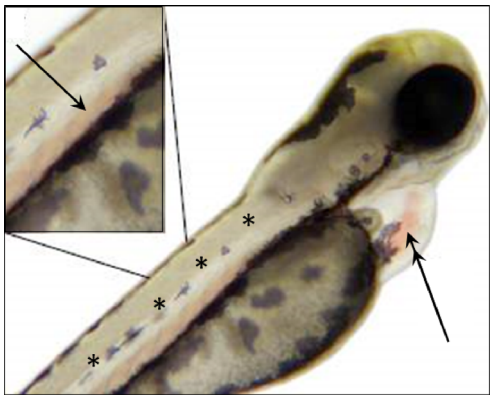
Astes dīgļa neatdalīšanās sānskatā



(a: →; 96 h vecs zebrzivs embrijs). Pievērsiet uzmanību arī acs dīgļa neesībai(*).

4. attēls

Neesošu sirdsdarbību



Neesošu sirdsdarbību pēc definīcijas ir grūti ilustrēt mikrogrāfijā. Par sirdsdarbības neesību liecina sirds konvulsiju neesība (dubultā bultiņa). Asins šūnu nekustīgums, piemēram, aortā *abdominalis* (→ iespraudumā) nav neesošas sirdsdarbības rādītājs. Pievērsiet uzmanību arī tam, ka šajā embrijā neveidojas somīti (*, muskuļi izskatās drīzāk viendabīgi, nevis segmentēti). Novērošanas laikam neesošas sirdsdarbības reģistrēšanai jābūt vismaz vienai minūtei ar minimālo palielinājumu 80×.

▼M7

C.50. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* TOKSISKUMA BEZSEDIMENTU TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 238 (2014. gads). Tie izstrādāti, lai novērtētu ķimikāliju toksiskumu ūdens divdīgļlapjiem *Myriophyllum spicatum*, halorāgu dzimtas sugai. Tā pamatā ir *ASTM* standartnorādījumos ietilpstoša testēšanas metode (1), kas, lai novērtētu testējamo ķimikāliju patieso ekotoksiskumu (neatkarīgi no tā, kā testējamā ķimikālija sadalās pa ūdeni un sedimentiem), pārveidota par bezsedimentu testa sistēmu (2). Testa sistēma bez sedimentiem ir analītiski nesarežģīta (tikai ūdens fāzē), un rezultātus var analizēt paralēli un/vai salīdzinājumā ar rezultātiem, kas iegūti *Lemna sp.* testā (3); turklāt ar prasītajiem sterilajiem apstākļiem mikroorganismu un aļģu ietekmi (ķīmisko uzņemšanu/noārdīšanos u. c.) iespējams uzturēt pēc iespējas mazāku. Šis tests neaizstāj citus ūdenstoksiskuma testus; tas drīzāk papildina tos tādējādi, ka ir iespējams pilnīgāk novērtēt bīstamību un risku ūdensaugiem. Testēšanas metode ir validēta starplaboratoriju salīdzināšanā (4).

2. Ir sniegta detalizēta informācija par testēšanu ar testējamā šķīduma atjaunošanu (pusstatiskā metode) un bez atjaunošanas (statiskā metode). Atkarībā no testa mērķiem un regulatīvajām prasībām pusstatisko metodi ir ieteicams izmantot, piemēram, vielām, kas šķīdumos ātri zūd izgarošanas, adsorbcijas, fotodegradācijas, hidrolīzes, izgulsnēšanās vai bionoārdīšanās rezultātā. Papildu norādījumi ir sniegti (5). Šī testēšanas metode attiecas uz vielām, kurām šī testēšanas metode ir validēta (sīkāku informāciju sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (4)), vai arī uz preparātiem vai zināmiem maisījumiem; ja testē maisījumu, iespējami jāidentificē tā komponenti un jāraksturo tie kvantitatīvi. *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu testēšanas metode papildina *Myriophyllum spicatum* ūdens–sedimentu toksiskuma testu (6). Pirms testēšanas metodi izmantot, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam nolūkam pietiekamus rezultātus, un, ja var, tad kāpēc. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

TESTA PRINCIPS

3. Nepārtraukti augošas *Myriophyllum spicatum* augu kultūras (tikai modificētā *Andrews* barotnē, sk. 2. papildinājumu) bezsedimentu testa sistēmā 14 dienas kā monokultūru audzē dažādās testējamās ķimikālijas koncentrācijās. Testa mērķis ir, pamatojoties uz konkrētu mērījumu mainīgo novērtējumiem, kvantitatīvi noteikt ar ķimikāliju saistīto ietekmi uz veģetatīvo augšanu šajā periodā. Mērījumu mainīgie ir dzinumu garuma, sānu zaru un sakņu pieaugums, kā arī svaigsvara un saussvara dinamika un mieturu skaita palielināšanās. Turklāt ņem vērā izteiktas kvalitatīvas pārmaiņas testa organismos, piemēram, kropļojumus vai hlorozi un nekrozi, par ko liecina dzeltēšana vai balta un brūna nokrāsa. Lai ar ķimikāliju saistīto ietekmi noteiktu kvantitatīvi, augšanu testa šķīdumos salīdzina ar augšanu kontrolēs, nosaka, kāda koncentrācija rada noteiktu augšanas inhibēšanos x %, un to izsaka kā EC_x; atkarībā no regulatīvajām prasībām "x" var būt jebkāda vērtība, piemēram, EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Jānorāda, ka EC_{10} un EC_{20} vērtību aplēses ir uzticamas un piemērotas tikai testos, kuros variācijas koeficienti kontrolaugiem ir zemāki par lēsto ietekmes līmeni, t. i., lai varētu stabili novērtēt EC_{20}, variācijas koeficientiem jābūt < 20 %.

4. Neapstrādātiem un apstrādātiem augiem jānosaka gan vidējais īpatnējais augšanas rādītājs (ko aplēš, novērtējot pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgos), gan arī pieaugums (ko aplēš, izmantojot pamatdzinuma garumu un trīs papildu mērījumu mainīgos). Pēc tam īpatnējo augšanas

▼M7

rādītāju (r) un pieaugumu (y) izmanto, lai noteiktu $E_r\ C_x$ (piem., $E_r\ C_{10}$, $E_r\ C_{20}$, $E_r\ C_{50}$) un attiecīgi $E_y\ C_x$ (piemēram, E_yC_{10}, $E_y\ C_{20}$, $E_y\ C_{50}$).

5. Papildus var statistiski noteikt zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*NOEC*).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

6. Ir jābūt pieejamai analītiskai metodei, kas ir pietiekami jutīga, lai noteiktu testējamās ķimikālijas daudzumu testa barotnē. Izstrādājot testa nosacījumus, par testējamo ķimikāliju var noderēt šāda informācija: struktūrformula, tīrība un piemaisījumi, šķīdība ūdenī, stabilitāte ūdenī un gaismā, skābes disociācijas konstante (pK_a), oktanola–ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}), tvaika spiediens un bionoārdāmība. Šķīdību ūdenī un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai testa periodā ir varbūtīgi būtiski testējamās ķimikālijas zaudējumi. Tas palīdzēs noskaidrot, vai ir jāveic īpaši pasākumi, kas šādus zaudējumus kontrolētu. Ja informācija par testējamās vielas šķīdību un stabilitāti ir neprecīza, ieteicams to novērtēt testa apstākļos, t. i., ar barotni, temperatūru, apgaismojuma režīmu, ko izmantos testa laikā.

7. Testa barotnes pH kontrolēt ir īpaši svarīgi, piemēram, testējot metālus vai hidrolītiski nestabilas vielas. Papildu norādījumi par tādu ķimikāliju testēšanu, kuru testēšanu apgrūtina to fizikālķīmiskās īpašības, sniegti ESAO Norādījumu dokumentā (5).

TESTA DERĪGUMS

8. Lai tests būtu derīgs, kontroles pamatdzinumu garumam jādubultojas īsākā laikā nekā 14 dienās. Izmantojot šajā testēšanas metodē aprakstītās barotnes un testa nosacījumus, šo kritēriju var izpildīt, izmantojot statisku vai pusstatisku testa režīmu.

9. Pieauguma vidējais variācijas koeficients, kas iegūts no dzinumu svaigsvara mērījumiem (t. i., no testa sākuma līdz beigām) un papildu mērījumu mainīgajiem (sk. 37. punktu), kontrolkultūrās starp replikātiem nepārsniedz 35 %.

10. Vairāk nekā 50 % kontrolgrupas replikātu visā 14 dienu ekspozīcijas periodā uztur sterilus, kas nozīmē, ka tajos nav saskatāma kontaminācija ar citiem organismiem, piemēram, aļģēm, sēnītēm un baktērijām (skaidrs šķīdums). *Piezīme:* Norādījumi par to, kā novērtēt sterilitāti, sniegti starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (4).

STANDARTĶIMIKĀLIJA

11. Lai pārbaudītu testēšanas procedūru, var testēt standartķimikāliju(-as), piemēram, 3,5-dihlorfenolu, kas izmantots starplaboratoriju salīdzināšanā (4); saskaņā ar starplaboratoriju salīdzināšanas datiem 3,5-DCP vidējās EC_{50} vērtības attiecībā uz dažādajiem atkarīgiem mainīgajiem (sk. šīs testēšanas metodes 37.–41. punktu) ir no 3,2 mg/l līdz 6,9 mg/l (informāciju par šo vērtību ticamības intervālu sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā). Standartķimikāliju ieteicams testēt vismaz divreiz gadā vai, ja testus veic retāk, vienlaikus ar testējamās ķimikālijas toksiskuma noteikšanu.

▼M7

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

12. Visam aprīkojumam, kas nonāk saskarē ar testa barotni, jābūt no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla. No kultūras audzēšanai un testēšanai izmantotajiem stikla traukiem jānotīra ķīmiskie kontaminanti, kas var ieskaloties testa barotnē, un traukiem jābūt steriliem. Testa traukiem jābūt pietiekami augstiem, lai dzinumi kontroles traukos augtu ūdens fāzē, testa beigās nesasniedzot testa barotnes virsmu. Ieteicamas borsilikāta stikla mēģenes ar biezām sienām bez snīpja, iekšējais diametrs apmēram 20 mm, garums aptuveni 250 mm, ar alumīnija vāciņiem.

13. Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē sēnīšu un baktēriju augšanu), testa šķīdumi ir jāsagatavo sterilos apstākļos. Visus šķidrumus un aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē. Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h ilgu apstrādi ar sakarsētu gaisu (210 °C) vai 20 min autoklavēšanu 121 °C temperatūrā. Turklāt tieši pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

14. Kultūras un testa traukus nedrīkst turēt kopā. To vislabāk var panākt, izmantojot atsevišķas augšanas vides kameras, inkubatorus vai telpas. Apgaismojumam un temperatūrai jābūt kontrolējamiem, un tie jāuztur nemainīgā līmenī.

Testa organisms

15. Ūdens divdīgļlapis *Myriophyllum spicatum* ir halorāgu dzimtas suga. No jūnija līdz augustam virs ūdens virsmas redzami neuzkrītoši balti rozā ziedi. Augi sakņojas zemē ar spēcīgu sakneņu sistēmu un ir sastopami visā ziemeļu puslodē eitrofiskos, bet nepiesārņotos stāvošos ūdeņos ar dubļainu substrātu un samērā augstu kalcija saturu. *Myriophyllum spicatum* dod priekšroku saldūdenim, bet to var atrast arī iesāļā ūdenī.

16. Bezsedimentu toksiskuma testam ir vajadzīgi sterili augi. Ja testēšanas laboratorija *Myriophyllum spicatum* nekultivē, sterilu augu materiālu var iegūt no citas laboratorijas, (nesterilu) augu materiālu var ņemt no lauka vai to var nodrošināt komerciāls piegādātājs; ja augi ņemti no lauka, jāparedz sugas taksonomiskā verifikācija. No lauka ievākti vai komerciāla piegādātāja piegādāti augi jāsterilizē (1) un vismaz astoņas nedēļas pirms lietošanas jātur kultūrā tajā pašā barotnē, ko izmanto testēšanai. Ja augus vāc laukā, vietām, kur ievāc kultūras sākummateriālu, jābūt bez redzamiem kontaminācijas avotiem. Liela uzmanība jāpievērš tam, lai nodrošinātu, ka, *Myriophyllum spicatum* vācot no lauka, tiek iegūtas pareizās sugas, jo īpaši reģionos, kur augi var sakrustoties ar citām *Myriophyllum* sugām. Ja augu materiāls iegūts no citas laboratorijas, tie vismaz trīs nedēļas jātur līdzīgos apstākļos. Ziņojumā vienmēr jāatspoguļo augu materiāla avots un testēšanai izmantotā suga.

17. Testā izmantojamo augu kvalitāte un viendabīgums būtiski ietekmē testa rezultātus, tāpēc tie jāizraugās rūpīgi. Jāizmanto jauni, strauji augoši augi bez redzamiem bojājumiem vai krāsas izmaiņām (hlorozes). Sīkāka informācija par testa organisma sagatavošanu dota 4. papildinājumā.

Kultivēšana

18. Lai manipulācijas kultūras uzturēšanai varētu veikt retāk (piem., ja kādā periodā *Myriophyllum* testus neplāno), kultūru var turēt samazinātā apgaismojumā un temperatūrā (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Sīkāka informācija par kultivēšanu dota 3. papildinājumā.

▼M7

19. Vismaz 14 līdz 21 dienu pirms testēšanas pietiekamu skaitu testa organismu aseptiski ievieto svaigā, sterilā barotnē un 14 līdz 21 dienu testa apstākļos kultivē kā pirmkultūru. Detalizēta informācija par pirmkultūras sagatavošanu dota 4. papildinājumā.

Testa barotne

20. Bezsedimentu testa sistēmā *Myriophyllum spicatum* ieteicama tikai viena barotne, kas aprakstīta 2. papildinājumā. 1. punktā aprakstītajai *Myriophyllum spicatum* kultūras audzēšanai un testēšanai ar to ieteicama modificēta *Andrews* barotne. Modificēto *Andrews* barotni iegūst no pieciem atsevišķi sagatavotiem barības izejšķīdumiem, pievienojot 3 % saharozes. Detalizēta informācija par barotnes sagatavošanu dota 2. papildinājumā.

21. Testa šķīdumus iegūst no desmitkārtīgi koncentrētas modificētas *Andrews* barotnes (atšķaida pēc vajadzības). Šīs barotnes sastāvs dots 2. papildinājumā.

Testa šķīdumi

22. Testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Testējamās ķimikālijas izejšķīdumus parasti sagatavo, ķimikāliju izšķīdinot demineralizētā (destilētā vai dejonizētā) ūdenī. Barības elementus pievieno, izmantojot desmitkārtīgi koncentrētu modificēto *Andrews* barotni.

23. Testējamās ķimikālijas izejšķīdumus var sterilizēt, tos 20 minūtes 121 °C temperatūrā apstrādājot autoklāvā vai izmantojot sterilu filtrāciju, ar nosacījumu, ka sterilizācijas metode nedenaturē testējamo ķimikāliju. Testa šķīdumus var sagatavot arī sterilā demineralizētā ūdenī vai barotnē sterilos apstākļos. Izvēloties testējamās ķimikālijas izejšķīdumu sterilizācijas procedūras, jāņem vērā to termostabilitāte un adsorbēšanās uz dažādām virsmām. Tāpēc izejšķīdumus ieteicams sagatavot sterilos apstākļos, t. i., testējamās ķimikālijas šķīdināšanai sterilā ūdenī sterilos apstākļos (piemēram, sterilizācija ar liesmu, laminārās plūsmas pārsegi u. c.) izmantojot sterilu materiālu. Šis sterilu izejšķīdumu sagatavošanas paņēmiens der gan vielām, gan maisījumiem.

24. Parasti testa apstākļos augstākā testējamās ķimikālijas koncentrācija nedrīkst pārsniegt tās šķīdību ūdenī. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas slikti šķīst ūdenī, lai testējamo ķimikāliju būtu vieglāk precīzā daudzumā pievienot testa barotnei un lai ķimikālija labāk disperģētu un šķīstu, var būt nepieciešams koncentrētu izejšķīdumu vai dispersiju sagatavot, izmantojot organisku šķīdinātāju vai izkliedētājvielu. Jādara viss iespējamais, lai šādus materiālus neizmantotu. Papildu šķīdinātāju vai izkliedētājvielu izmantošana nedrīkst radīt fitotoksiskumu. Bieži izmantoti šķīdinātāji, kas koncentrācijās līdz 100 µl/l nav fitotoksiski, ir, piemēram, acetons un dimetilformamīds. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkliedētājvielu, ziņojumā jāatspoguļo tās galīgā koncentrācija, kas jāuztur minimāla (≤ 100 µl/l), un tā pati šķīdinātāja vai izkliedētājvielas koncentrācija jāizmanto visās apstrādēs un kontrolēs. Papildu norādījumi par izkliedētājvielu izmantošanu ir sniegti (5).

Testa grupas un kontrolgrupas

25. Piemērotas testējamās koncentrācijas izraudzīties palīdzēs diapazona noteikšanas testā iegūtas iepriekšējas zināšanas par testējamās ķimikālijas toksiskumu attiecībā uz *Myriophyllum spicatum*. Galīgajā toksiskuma testā parasti ir no piecām (līdzīgi kā *Lemna* augšanas kavēšanas testā, C.26. nodaļa šajā pielikumā) līdz septiņām testējamajām koncentrācijām, kas sakārtotas ģeometriskās progresijās; tās jāizvēlas tā, lai koncentrācijas diapazons būtu no vērtības *NOEC* līdz

▼M7

vērtībai EC_{50} (sk. turpmāk). Vēlams, lai testējamo koncentrāciju atstatuma koeficients nepārsniegtu 3,2; tomēr, ja koncentrācijas–atbildreakcijas līkne ir taisna, var izmantot lielāku vērtību. Ja izmanto mazāk nekā piecas koncentrācijas, tas jāpamato. Katrai testējamajai koncentrācijai jāizmanto vismaz pieci replikāti.

26. Nosakot testējamo koncentrāciju diapazonu (diapazona noteikšanas un/vai galīgajā toksiskuma noteikšanas testā), jāņem vērā turpmāk minētais.

Nosakot EC_x, attiecīgu ticamības līmeni var nodrošināt, ja testējamās koncentrācijas ir tādas, ka vērtība EC_x atrodas starp tām. Piemēram, ja aprēķina EC_{50}, augstākajai testējamajai koncentrācijai jāpārsniedz vērtība EC_{50}. Ja vērtība EC_{50} neiekļaujas testējamo koncentrāciju diapazonā, saistītie ticamības intervāli būs lieli, un var nebūt iespējams novērtēt modeļa statistisko piemērotību.

Ja mērķis ir novērtēt *LOEC*/*NOEC*, zemākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami zemai, lai pieaugums nebūtu būtiski mazāks par pieaugumu kontrolē. Turklāt augstākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai pieaugums būtu būtiski mazāks par pieaugumu kontrolē. Ja tas tā nav, tests ir jāatkārto, izmantojot citu koncentrāciju diapazonu (ja vien augstākā koncentrācija nepārsniedz šķīdības robežu vai maksimāli nepieciešamo robežkoncentrāciju, piemēram, 100 mg/l).

27. Katrā testā jāiekļauj kontroles, kuru sastāvā ir tā pati barotne, testa organisms (izvēloties iespējami viendabīgu auga materiālu, svaigus sānu zarus no pirmkultūras, kas saīsināti līdz 2,5 cm no pamatnes), ievēroti tie paši vides apstākļi un procedūras kā testa traukos, bet bez testējamās ķimikālijas. Ja lieto papildu šķīdinātāju vai izkliedētājvielu, iekļauj papildu kontroli, proti, apstrādi ar šķīdinātāju/izkliedētājvielu tādā pašā koncentrācijā, kāda ir traukos ar testējamo ķimikāliju. Kontroles trauku (un attiecīgā gadījumā šķīdinātāju trauku) replikātu skaitam jābūt vismaz desmit.

28. Ja nav jānosaka *NOEC*, testa plānu var mainīt, palielinot koncentrāciju skaitu un samazinot vienas koncentrācijas replikātu skaitu. Tomēr jebkurā gadījumā jābūt vismaz desmit kontroles replikātiem.

Ekspozīcija

29. No pirmkultūras ņemtus svaigus sānu zarus, kas saīsināti līdz 2,5 cm no pamatnes, aseptiskos apstākļos randomizēti sadala pa testa traukiem; katrā testa traukā jābūt vienam 2,5 cm sānu zaram, kam vienā galā ir galotnes meristēma. Visiem testa traukiem jāizraugās vienādi kvalitatīvs augu materiāls.

30. Lai samazinātu telpisko atšķirību ietekmi uz gaismas intensitāti vai temperatūru, testa trauku izvietojums inkubatorā jāplāno randomizēti. Bloķēts plānojums vai randomizēta trauku pārvietošana (vai biežāka pārvietošana) vajadzīga arī attiecībā uz novērojumu veikšanu.

31. Ja iepriekšējās stabilitātes tests parāda, ka visā testa laikā (14 dienas) testējamās ķimikālijas koncentrāciju nevar uzturēt (t. i., izmērītā koncentrācija samazinās zem 80 % no izmērītās sākotnējās koncentrācijas), ieteicams pusstatiskais testa režīms. Šajā gadījumā augi testa laikā vismaz vienreiz

▼M7

(piemēram, 7. dienā) jāeksponē svaigi sagatavotiem testa un kontroles šķīdumiem. Cik bieži eksponēt svaigai barotnei, būs atkarīgs no testējamās ķimikālijas stabilitātes; lielāks biežums var būt nepieciešams, lai uzturētu gandrīz nemainīgu koncentrāciju ļoti nestabilām vai gaistošām ķimikālijām.

32. Šī testēšanas metode neaptver ekspozīcijas scenārijus ar ievadīšanu uz lapām (aerosols).

Testa nosacījumi

33. Jāizmanto silti un/vai vēsi balts dienasgaismas apgaismojums, nodrošinot gaismas starojumu diapazonā apmēram 100–150 E m^{-2} s^{-1}, to mērot kā fotosintēzes aktīvo starojumu (400–700 nm) punktos, kuri no gaismas avota ir tādā pašā atstatumā kā testa trauku dibens (ekvivalents ca. 6 000–9 000 lux), un izmantojot gaismas un tumsas ciklu 16:8 h. Izmērīto vērtību ietekmēs gaismas detektēšanas un mērīšanas metode, jo īpaši sensora veids. Salīdzinājumā ar vienvirziena sensoriem vēlamāki ir sfēriski sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes un zem tās) un kosinusa formas sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes), ar kuriem var iegūt precīzākus šeit aprakstīto daudzleņķu gaismas avotu nolasījumus.

34. Temperatūrai testa traukos jābūt 23 ± 2 °C. Īpašos gadījumos, piemēram, testējot nestabilas ķimikālijas vai metālus, papildu uzmanība jāveltī pH svārstībām; pH jāuztur robežās no 6 līdz 9. Sk. papildu norādījumus (5).

Ilgums

35. Testu beidz 14 dienas no brīža, kad augi ievietoti testa traukos.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

36. Testa sākumā testa organisma pamatdzinumu garums ir 2,5 cm (sk. 29. punktu); to mēra ar mērlineālu (sk. 4. papildinājumu) vai analizējot fotogrāfijas un attēlus. Testa organisma pamatdzinumu garums — normāls vai anormāls — jānosaka testa sākumā, vismaz vienreiz 14 dienu ekspozīcijas perioda laikā un testa beigās. Piezīme. Kā alternatīva tiem, kam nav pieejama attēla analīze: ja darbgaldu pirms augu ievietošanas testa traukos sterilizē, testa sākumā un testa laikā pamatdzinumu garumu mērīt var arī ar sterilu mērlineālu. Jāatzīmē pārmaiņas augu attīstībā, piem., dzinumu deformācijas, izskats, liecības par nekrozi, hlorozi, lūšanu vai peldspējas zudumu un sakņu garums un izskats. Jāatzīmē arī būtiskas testa barotnē novērotas pazīmes (piemēram, neizšķīduša materiāla, aļģu, sēnīšu un baktēriju klātbūtne testa traukā).

37. Papildus pamatdzinumu garuma noteikšanai testa laikā ir jānovērtē arī testējamās ķimikālijas ietekme uz šādiem trīs (vai vairāk) mērījumu mainīgajiem:

i. Kopējais sānu zaru garums.

ii. Kopējais dzinumu garums.

iii. Kopējais sakņu garums.

iv. Svaigsvars.

v. Saussvars.

vi. Mieturu skaits.

▼M7

1. piezīme. Attiecīgus papildu mērījumus no sešiem šeit dotajiem mainīgajiem var izraudzīties, izmantojot diapazona noteikšanas testa laikā veiktos novērojumus.

2. piezīme. Ļoti vēlama ir svaigsvara un saussvara noteikšana (iv un v parametrs).

3. piezīme. Sakarā ar to, ka saharoze un gaisma (sakņu ekspozīcija gaismai testa laikā) var ietekmēt auksīna (augu augšanas hormons) transportētājus un ka dažām ķimikālijām var būt auksīna veida iedarbība, sakņu beigupunktu (iii parametra) iekļaušana ir apšaubāma.

4. piezīme. Starplaboratoriju salīdzināšanas rezultāti liecina par augstiem variācijas koeficientiem (> 60 %) attiecībā uz kopējo sānu zaru garumu (i parametrs). Kopējais sānu zaru garums jebkurā gadījumā ir ietverts kopējā dzinumu garuma mērījumā (ii parametrs), kam konstatēti pieņemamāki variācijas koeficientus < 30 %.

5. piezīme. Kā izriet no iepriekš minētajiem apsvērumiem, ieteicamie galvenie mērījumu beigupunkti ir: kopējais dzinumu garums, svaigsvars un saussvars (ii, iv un v parametrs); vi parametrs – mieturu skaits – paliek eksperimenta veicēja ziņā.

38. Pamatdzinumu garums un mieturu skaits ir izdevīgi, jo katram testam un kontroles traukam tos testa sākumā, tā laikā un beigās var noteikt, izmantojot fotogrāfijas un attēla analīzi, lai gan var izmantot arī (sterilu) mērlineālu.

39. Kopējo sānu zaru garumu, kopējo sakņu garumu (kā visu sānu zaru vai sakņu garumu summu) un kopējo dzinumu garumu (kā pamatdzinumu garuma un kopējā sānu zaru garuma summu) var izmērīt ar mērlineālu ekspozīcijas beigās.

40. Svaigsvars un/vai saussvars ir jānosaka testa sākumā paraugam no pirmkultūras materiāla, kas izmantots testa sākšanai, un testa beigās augu materiālam no katra testa un kontroles trauka.

41. Kopējo sānu zaru garumu, kopējo dzinumu garumu, kopējo sakņu garumu, svaigsvaru, saussvaru un mieturu skaitu var noteikt šādi:

i. Kopējais sānu zaru garums. Sānu zaru garumu var noteikt, ekspozīcijas beigās visus sānu zarus izmērot ar mērlineālu. Kopējais sānu zaru garums ir katra testa un kontroles trauka visu sānu zaru garumu summa.

ii. Kopējais dzinumu garums. Pamatdzinumu garumu var noteikt ar attēlu analīzi vai izmantojot mērlineālu. Kopējais dzinumu garums ir katra testa un kontroles trauka kopējā sānu zaru garuma un pamatdzinumu garuma summa ekspozīcijas beigās.

iii. Kopējais sakņu garums. Sakņu garumu var noteikt, ekspozīcijas beigās izmērot visas saknes ar mērlineālu. Kopējais sakņu garums ir katra testa un kontroles trauka visu sakņu garuma summa.

iv. Svaigsvars. Svaigsvaru var noteikt, nosverot testa organismus ekspozīcijas beigās. Viss katra testa un kontroles trauka augu materiāls jānoskalo

▼M7

ar destilētu ūdeni, ar celulozes papīru jānosusina sauss. Pēc šīs sagatavošanas ar svēršanu nosaka svaigsvaru. Sākuma biomasu (svaigsvaram) nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota sēšanai testa traukos.

v. Saussvars. Pēc sagatavošanās svaigsvara noteikšanai testa organismus žāvē 60 °C līdz konstantam svaram. Šī masa ir saussvars. Sākuma biomasu (saussvaram) nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota uzsēšanai testa traukos.

vi. Mieturu skaits. Visus mieturus skaita uz āru gar pamatdzinumu.

Mērījumu biežums un analītiskā noteikšana

42. Ja izmantoto statisko testa plānu, pH jāmēra katrai apstrādei testa sākumā un beigās. Ja izmanto pusstatisku testa plānu, pH jāmēra katrai svaiga testa šķīduma partijai pirms katras atjaunošanas un arī citiem analogiem izlietotiem šķīdumiem.

43. Gaismas intensitāte audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā jāmēra punktos, kas no gaismas avota atrodas tādā pašā attālumā kā testa organismi. Mērījumi testa laikā jāveic vismaz vienu reizi. Surogāttraukā, kur tiek uzturēti tādi paši apstākļi kā audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā, vismaz katru dienu (vai nepārtraukti, izmantojot datu reģistrētāju) jāreģistrē barotnes temperatūra.

44. Testa laikā testējamās(-o) ķimikālijas(-u) koncentrācijas nosaka attiecīgos intervālos. Statiskos testos minimālā prasība ir noteikt koncentrāciju testa sākumā un beigās.

45. Pusstatiskos testos, kuros nav gaidāms, ka testējamās(-o) ķimikālijas(-u) koncentrācijas saglabāsies ± 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, jāanalizē visi svaigi sagatavotie testa šķīdumi un tie paši šķīdumi katrā atjaunošanas reizē. Tomēr tādos testos, kur testējamās(-o) ķimikālijas(-u) izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % robežās no nominālās vērtības, bet kur var nodrošināt pietiekamus pierādījumus, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % robežās no sākotnējās koncentrācijas), ķīmisko noteikšanu var veikt tikai attiecībā uz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju. Visos gadījumos testējamās koncentrācijas pirms atjaunošanas attiecībā uz katru testējamo koncentrāciju jānoteic tikai viena replikāta traukā (vai replikātā apvienotam trauku saturam).

46. Ja ir pierādījumi, ka testējamā koncentrācija visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % robežās no nominālās vērtības vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, rezultātus var analizēt, pamatojoties uz sākotnējām nominālajām vai izmērītajām vērtībām. Ja novirze no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas nav ± 20 % robežās, rezultāti jāanalizē, balstoties uz ģeometrisko vidējo koncentrāciju ekspozīcijas laikā vai modeļiem, kas apraksta testējamās ķimikālijas koncentrācijas samazināšanos (5).

Robežtests

47. Dažos gadījumos, piemēram, ja iepriekšējais tests uzrāda, ka testējamai ķimikālijai koncentrācijā līdz 100 mg/l, līdz tās šķīdības robežai testa barotnē, vai attiecībā uz preparātiem — līdz tās izkliedējamības robežai nav toksiskas iedarbības, var veikt robežtestu, kurā salīdzina atbildreakcijas kontroles grupā un vienā apstrādes grupā (100 mg/l vai koncentrācija, kas ekvivalenta

▼M7

šķīdības robežai). Ir ļoti ieteicams to pamatot ar ekspozīcijas koncentrācijas analīzi. Uz robežtestu attiecas visi iepriekš aprakstītie testa nosacījumi un derīguma kritēriji, izņemot, ka apstrādes replikātu skaits jādubulto. Augšanu kontroles un apstrādes grupā var analizēt, izmantojot statistikas testu, lai salīdzinātu vidējos rādītājus, piemēram, Stjūdenta t testu.

DATI UN ZIŅOŠANA

Atkarīgie mainīgie

48. Testa mērķis ir noteikt testējamās ķimikālijas ietekmi uz *Myriophyllum spicatum* veģetatīvo augšanu. Šī testēšanas metode apraksta divus atkarīgos mainīgos.

a) Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs. Šo atkarīgo mainīgo aprēķina, pamatojoties uz izmaiņām pamatdzinumu garuma logaritmā un turklāt pamatojoties uz logaritmu izmaiņām, kas skar pārējos mērījumu parametrus, t. i, kopējo dzinumu garumu, svaigsvaru, saussvaru vai mieturu skaitu laika periodā (izteikts dienās) kontroles grupās un katrā apstrādes grupā. Piezīme. Mērīšanas parametram kopējais sānu zaru garums un kopējais sakņu garums vidējo īpatnējo augšanas rādītāju aprēķināt nav iespējams. Sākot testu, testa organismam nav sānu zaru un nav saknes (pamatā ir sagatavojumi no pirmkultūras); ja sāk no nulles vērtības, vidējā īpatnējā augšanas rādītāja aprēķināšana nav nosakāma.

b) Pieaugums. Šo atkarīgo mainīgo aprēķina, par pamatu ņemot līdz testa beigām novērotās pamatdzinumu garuma pārmaiņas un turklāt pārmaiņas citos mērīšanas parametros — t. i., vēlams, kopējā dzinumu garumā, svaigsvarā, saussvarā vai mieturu skaitā un citos parametros, ja to uzskata par noderīgu — kontrolēs un katrā apstrādes grupā.

49. Toksiskuma aplēses jābalsta uz pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams, kopējo dzinumu garumu, svaigsvaru, saussvaru vai mieturu skaitu, sk. 37. punktu un šā punkta 2., 4. un 5. piezīmi), jo dažas ķimikālijas citus mērījumu mainīgos var ietekmēt daudz vairāk nekā pamatdzinumu garumu. Ja aprēķinātu tikai pamatdzinumu garumu, šāda ietekme nebūtu atklāta.

Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs

50. Vidējo īpatnējo augšanas rādītāju noteiktam periodam aprēķina kā logaritmisko pieaugumu attiecībā uz augšanas mainīgajiem — pamatdzinumu garumu un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., kopējo dzinumu garumu, svaigsvaru, saussvaru vai mieturu skaitu) — katram kontroles un apstrādes replikātam izmantojot šādu formulu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

kur:

μ_{i-j}: vidējais īpatnējais augšanas rādītājs no laikpunkta i līdz j;

N_i: mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikā i;

N_j: mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikā j;

t: laika periods no i līdz j.

▼M7

Katrai apstrādes grupai un kontrolgrupai augšanas rādītāja vidējo vērtību aprēķina kopā ar dispersijas aplēsēm.

51. Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs jāaprēķina visam testa periodam (iepriekš minētajā formulā laikpunkts "i" ir testa sākums un laikpunkts "j" ir testa beigas). Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei aprēķina vidējā īpatnējā augšanas rādītāja vidējo vērtību, kā arī dispersiju. Turklāt, lai izvērtētu ekspozīcijas periodā radušās testējamās ķimikālijas ietekmes, augšanas rādītājs jāizvērtē pa posmiem, (piemēram, izmantojot logaritmiski transformētas augšanas līknes).

52. Augšanas rādītāja procentuālo inhibēšanos (I_r) katrai testējamajai koncentrācijai (apstrādes grupā) var aprēķināt saskaņā ar šādu formulu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kur:

% Ir: vidējā īpatnējā augšanas rādītāja inhibēšanās procents;

μC: vidējā vērtība μ kontrolē;

μT: vidējā vērtība μ apstrādes grupā.

Pieaugums

53. Ietekmi uz pieaugumu nosaka, pamatojoties uz mērījumu mainīgo "pamatdzinumu garums" un trīs papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits) katrā testa traukā testa sākumā un beigās. Svaigsvaram vai saussvaram sākotnējo biomasu nosaka, pamatojoties uz testa organismu paraugu, kas ņemts no tās pašas partijas, kura izmantota sēšanai testa traukos. Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei vidējo pieauguma vērtību aprēķina kopā ar dispersijas aplēsēm. Vidējo procentuālo pieauguma inhibēšanos (% I_y) katrai apstrādes grupai var aprēķināt šādi:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

kur:

% Iy: pieauguma procentuālais samazinājums;

bC: beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa kontroles grupai;

bT: beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa apstrādes grupai.

Laika divkāršošana

54. Lai noteiktu pamatdzinumu garuma divkāršošanās laiku (T_d) un atbilstību šim derīguma kritērijam (sk. 8. punktu), izmanto šādu formulu ar datiem, kas iegūti no kontroles traukiem:

$T_d = \ln 2/\mu$

μ ir vidējais īpatnējais augšanas rādītājs, ko nosaka, kā aprakstīts 50.–52. punktā.

▼M7

Koncentrācijas–atbildreakcijas līkņu grafiskā attēlošana

55. Grafiski jāattēlo koncentrācijas–atbildreakcijas līknes, kas atspoguļo sakarību starp atkarīgā mainīgā vidējo procentuālo inhibēšanos (I_r vai I_y aprēķina, kā parādīts 53. punktā) un testējamās ķimikālijas logaritmizētu koncentrāciju.

***EC*$_x$ aplēse**

56. EC_x aplēses jābalsta gan uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju (E_r C_x), gan pieaugumu (E_y C_x), no kuriem katrs savukārt jābalsta uz pamatdzinumu garumu, un, iespējams, papildu mērījumu mainīgajiem (t. i., vēlams, kopējo dzinumu garumu, svaigsvaru, saussvaru vai mieturu skaitu). Tas ir tāpēc, ka ir ķimikālijas, kas atšķirīgi ietekmē pamatdzinumu garumu un citus mērījumu mainīgos. Tādēļ vēlamie toksiskuma parametri katram aprēķinātajam inhibēšanās līmenim x ir četras EC_x vērtības: E_rC_x (pamatdzinumu garums); E_rC_x (i.e. t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits); E_yC_x (pamatdzinumu garums); un E_yC_x (t. i., vēlams kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits).

57. Jānorāda, ka EC_x vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos divus atkarīgos mainīgos, nav salīdzināmas, un testa rezultātu izmantošanā šo atšķirību ņem vērā. Ja tiek ievēroti šīs testēšanas metodes testa nosacījumi, lielākajā daļā gadījumu (sakarā ar attiecīgo pieeju matemātisko pamatojumu) uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju (E_r C_x) balstītās EC_x vērtības būs lielākas par rezultātiem, kas balstīti uz pieaugumu (E_y C_x). Šo starpību nedrīkst interpretēt kā abu atkarīgo mainīgo jutības starpību, jo šīs vērtības gluži vienkārši ir matemātiski atšķirīgas.

Statistiskās procedūras

58. Mērķis ir regresijas analīzē iegūt koncentrācijas–atbildreakcijas kvantitatīvu sakarību. Iespējams izmantot svērto lineāro regresiju pēc tam, kad veikta atbildreakcijas datu linearizējoša transformācija, piemēram, ar probita vai logita, vai Veibula sadalījuma modeļiem (7), bet priekšroka tiek dota nelineārās regresijas procedūru metodēm, ar kurām labāk risināt neizbēgamās datu neatbilstības un novirzes no līdzsvarota sadalījuma. Tuvu pie nulles vai pilnīgas inhibēšanās šādas neatbilstības var pastiprināt arī transformācija, kas traucē analīzi (7). Jāatzīmē, ka standarta analīzes metodes, kurās izmantoti probita, logita vai Veibula transformācijas modeļi, ir paredzētas tam, lai apstrādātu binārus datus (piemēram, mirstība vai izdzīvotība), un augšanas rādītāja vai pieauguma datiem tās būtu jāpielāgo. Īpašas procedūras EC_x vērtību noteikšanai, kurā izmanto nepārtrauktus datus, sk. (8), (9), (10).

59. Katram analizējamajam atkarīgam mainīgajam aprēķina EC_x vērtību punktu aplēses, izmantojot koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību. Ja iespējams, katrai aplēsei jāparedz 95 % ticamības robeža. Atbildreakcijas datu atbilstība regresijas modelim jāvērtē vai nu grafiski, vai statistiski. Regresijas analīze jāveic, izmantojot atsevišķu replikātu atbildreakcijas, nevis apstrādes grupas vidējos rādītājus.

60. Ja pieejamie regresijas modeļi/metodes datiem nav piemēroti, EC_{50} aplēses un ticamības robežu var iegūt arī, izmantojot lineāro interpolāciju ar paškorelācijas (*bootstrapping*) metodi (10).

61. *LOEC* un līdz ar to *NOEC* novērtēšanai ir jāsalīdzina apstrādes vidējie rādītāji, izmantojot dispersijas analīzes (*ANOVA*) metodes. Katras koncentrācijas vidējo rādītāju, izmantojot piemērotu daudzkārtēju salīdzināšanu vai

▼M7

dinamikas rindas trendu analīzes metodi salīdzina ar kontroles vidējo rādītāju. Noderīgi var būt Daneta vai Viljamsa testi, (12), (13), (14), (15), (16). Ir nepieciešams novērtēt, vai *ANOVA* pieņēmums par dispersijas viendabīgumu ir spēkā. Šo novērtējumu var veikt grafiski vai ar formālu testu (15). Piemēroti testi ir Lēvena vai Bartleta tests. Ja nav izpildīts pieņēmums attiecībā uz dispersijas homogenitāti, to dažreiz var labot, datus transformējot logaritmiski.. Ja dispersijas neviendabīgums ir galējs un ar transformāciju koriģēt to nevar, jāapsver, vai analīzi neveikt ar tādām metodēm kā descendenti Džonkhīra testi. Papildu norādījumus par *NOEC* noteikšanu var atrast (10).

62. Jaunāko zinātnisko sasniegumu rezultātā ir radies ieteikums atteikties no jēdziena *NOEC* un to aizstāt ar EC_x punktu aplēsēm, kuru pamatā ir regresija. Šim *Myriophyllum* testam nav noteikta piemērota x vērtība. Tomēr lietderīgs šķiet diapazons no 10 līdz 20 % (atkarībā no izvēlētā atkarīgā mainīgā), un ir vēlams ziņojumā atspoguļot gan EC_{10}, gan EC_{20} un to ticamības robežas.

Ziņošana

63. Testa pārskatā iekļauj šādu informāciju:

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta viela

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, IUPAC vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, attiecīgā gadījumā un, ja praktiski iespējams, piemaisījumu ķīmiskā identitāte u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs).

Vairākkomponentu viela, *UVCB* vai maisījums:

— tiek iespējami izsmeļoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga

— Zinātniskais nosaukums un avots.

Testa nosacījumi

— Izmantotā testa procedūra (statiska vai pusstatiska).

— Testa sākšanas datums un tā ilgums.

— Testa barotne.

— Eksperimentālā plāna apraksts: testa trauki un pārsegs, šķīdumu tilpumi, pamatdzinumu garums uz vienu testa trauku testa sākumā.

— Testējamās koncentrācijas (nominālās un izmērītās, kā vajadzīgs) un replikātu skaits uz koncentrāciju.

— Izejšķīdumu un testa šķīdumu sagatavošanas metodes, tostarp jebkāda šķīdinātāja vai izkliedētājvielas lietošana.

— Temperatūra testa laikā.

— Gaismas avots, gaismas intensitāte un viendabīgums.

— Testa un kontroles barotņu pH vērtības.

— Testējamās ķimikālijas analīzes metode ar attiecīgiem kvalitātes novērtēšanas datiem (validācijas pētījumi, analīžu standartnovirzes vai ticamības robežas).

▼M7

— Pamatdzinumu garuma un pārējo mērījumu mainīgo, piemēram, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita noteikšanas metodes.

— Katra testa un kontroles trauka kultūras stāvoklis (sterila vai nesterila) katrā novērojumā.

— Jebkādas novirzes no šīs testa metodes.

Rezultāti

— Izejas dati: attiecībā uz katru testa un kontroles trauku katram novērojumam un izdarītai analīzei — pamatdzinumu garums un citi mērījumu mainīgie.

— Katra mērījuma mainīgā vidējie rādītāji un standartnovirzes.

— Augšanas līknes katram mērījumu mainīgajam.

— Aprēķinātie atkarīgie mainīgie katram apstrādes replikātam, ar vidējām vērtībām un variāciju koeficientu replikātiem.

— Koncentrācijas/ietekmes sakarības grafisks attēlojums.

— Aplēses par toksiskajiem beigupunktiem atkarīgajiem mainīgajiem, piemēram, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, un saistītie ticamības intervāli. Ja aprēķinātas, *LOEC* un/vai *NOEC* un statistikas metodes, kas izmantotas to noteikšanai.

— Ja izmantota *ANOVA*, tad iedarbības lielums, ko var noteikt (piemēram, vismazākās būtiskās atšķirības).

— Jebkāda augšanas stimulēšana, kas konstatēta jebkurā apstrādē.

— Jebkādas fitotoksiskuma vizuālās pazīmes, kā arī testa šķīdumu novērojumi.

— Rezultātu apspriešana, tai skaitā jebkāda ietekme uz testa rezultātiem, kas izriet no novirzēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(2) Chapter C.26 of this Annex: Lemna sp. Growth Inhibition Test,.

(3) 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 Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) 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, Paris.

(5) Šā pielikuma C.51. nodaļa: Water-Sediment Myriophyllum spicatum Toxicity Test

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

▼**M7**

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(9) 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, Paris.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Biomasa ir populācijas dzīvās matērijas svaigsvars un/vai saussvars. Šajā testā biomasa ir pamatdzinumu, visu sānu zaru un visu sakņu summa.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Hloroze ir testa organisma, jo īpaši mieturu, krāsas maiņa no zaļas uz dzeltējošu.

***EC* x** ir testa barotnē izšķīdinātās testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas attiecīgajā ekspozīcijas periodā (īpaši jānorāda, ja ir novirzes no pilna vai normāla testa ilguma) rada *Myriophyllum spicatum* augšanas samazinājumu x % (piemēram, 50 %). Lai nepārprotami norādītu *EC* vērtību, kas izriet no augšanas rādītāja vai pieauguma, augšanas rādītājam izmanto simbolu "E_r *C*" un pieaugumam — "E_y *C*", kam seko izmantotais mērījumu mainīgais, piemēram, "E_rC" (pamatdzinumu garums).

Augšana ir mērījumu mainīgā, piemēram, pamatdzinumu garuma, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita palielināšanās testa periodā.

Augšanas rādītājs (vidējais īpatnējais augšanas rādītājs) ir mērījumu mainīgā logaritmisks pieaugums ekspozīcijas laikā. *Piezīme.* Ar augšanas rādītāju saistītie atkarīgie mainīgie nav atkarīgi no testa ilguma, ja vien neeksponētas kontroles organismu augšanas modelis ir eksponenciāls.

Zemākā novērotās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ir zemākā testējamās ķimikālijas koncentrācija, kurai noteiktā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontroli novērota statistiski būtiska samazinoša ietekme ($p < 0,05$). Tomēr pie visām testējamajām koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta.

Mērījumu mainīgie ir jebkāda veida mainīgie, kas tiek mērīti, lai izteiktu testa beigupunktu, izmantojot vienu vai vairākus atkarīgos mainīgos. Šajā testēšanas metodē mērījumu mainīgie ir pamatdzinumu garums, kopējais sānu zaru garums, kopējais dzinumu garums, kopējais sakņu garums, svaigsvars, saussvars un mieturu skaits.

Monokultūra ir kultūra ar vienu augu sugu.

Nekroze ir nedzīvi (t. i., balti vai tumši brūni) testa organisma audi.

Nenovērotās ietekmes koncentrācija (*NOEC*) ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas ir tūlīt zem *LOEC*.

Atkarīgais mainīgais ir toksiskuma aplēses mainīgais, ko ar dažādu aprēķina metožu palīdzību iegūst no jebkura mērītā mainīgā, kas apraksta biomasu. Šīs testēšanas metodes atkarīgie mainīgie ir augšanas rādītājs un pieaugums, kas iegūti no tādiem mērījumu mainīgajiem kā pamatdzinumu garums, kopējais dzinumu garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits.

Pusstatiskais (atjaunošanas) tests ir tests, kurā testa šķīdumu noteiktos intervālos testa laikā periodiski maina.

▼M7

Statiskais tests ir testēšanas metode bez testa šķīduma atjaunošanas testa laikā.

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Testa beigupunkts apraksta vispārīgo faktoru, kura mainīšana attiecībā pret testējamās ķimikālijas kontroli ir testa mērķis. Šajā testēšanas metodē testa beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko var izteikt ar dažādiem atkarīgajiem rādītājiem, kas ir balstīti uz vienu vai vairākiem mērījumu mainīgajiem.

Testa barotne ir pilna sintētiskā augšanas barotne, uz kuras aug testa augi laikā, kad tos eksponē testējamai ķimikālijai. Testējamo ķimikāliju parasti izšķīdina testa barotnē.

UVCB ir viela ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

Pieaugums ir mērījumu mainīgā vērtība, kas izsaka starpību starp biomasu ekspozīcijas perioda beigās un mērījumu mainīgo ekspozīcijas perioda sākumā. Piezīme. Ja neeksponētu organismu augšanas modelis ir eksponenciāls, uz pieaugumu balstīti atkarīgie mainīgie līdz ar testa ilgumu samazināsies.

▼M7

2. papildinājums

MODIFICĒTA *ANDREWS* BAROTNE IZEJKULTŪRAI UN PIRMKULTŪRAI

No pieciem atsevišķi sagatavotiem barotņu izejšķīdumiem pagatavo izejkultūrai un pirmkultūrai vajadzīgo modificēto *Andrews* barotni, pievienojot 3 % saharozes.

1. tabula

***Andrews* barotnes sastāvs: (*ASTM* apzīmējums E 1913-04)**

Barotņu izejšķīdumu pagatavošana			Barotnes pagatavošana
Izejšķīdums	Ķimikālija	Sākotnējais svars uz 1 000	ml uz 5 l barotnes
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Sk. zemāk izejšķīdumu 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Izejšķīdumu ledusskapī var turēt 6 mēnešus (5–10 °C temperatūrā). Mazāks glabāšanas laiks (2 mēneši) ir tikai izejšķīdumam Nr. 5.

2. tabula

Izejšķīduma 3.1 gatavošana izejšķīduma 3 sagatavošanai

Ķimikālija	Sākotnējais svars g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Pēc izejšķīduma 3.1 pagatavošanas (2. tabula) šo šķīdumu sasaldē aptuveni 11 ml alikvotās daļās (vismaz – 18 °C temperatūrā). Stipri sasaldētu porciju derīguma termiņš ir pieci gadi.

Lai pagatavotu izejšķīdumu 3, atkausē izejšķīdumu 3.1, 10 ml iepilda 1 l mērkolbā un tam pievieno augstākajā pakāpē tīru ūdeni līdz kolbas atzīmei.

Lai iegūtu modificētu *Andrews* barotni, 5 l mērkolbā iepilda aptuveni 2 500 ml augstākajā pakāpē tīru ūdeni. Pēc 50 ml pievienošanas no katra izejšķīduma mērkolbu 90 % no tilpuma pilda ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni un pH koriģē uz 5,8.

▼M7

Pēc tam pievieno 150 g izšķīdinātas saharozes (3 % uz 5 l); tad mērkolbu līdz atzīmei piepilda ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni. Visbeidzot, barotņu šķīdumu iepilda 1 l *Schott* kolbās un 20 minūtes sterilizē autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Šādi iegūtu barotni sterilu ledusskapī (5–10 °C) var uzglabāt trīs mēnešus.

Modificēta *Andrews* barotne bezsedimentu toksiskuma testā

No pieciem barotņu izejšķīdumiem, kas jau minēti 1. un 2. tabulā, pagatavo desmitkārtīgi koncentrētu, modificētu *Andrews* barotni, kas nepieciešama, lai iegūtu testa šķīdumus, pievienojot 30 % saharozes. Lai to izdarītu, 1 l mērkolbā iepilda aptuveni 100 ml augstākajā pakāpē tīra ūdens. Pievieno 100 ml no katra izejšķīduma, pH koriģē uz 5,8. Pēc tam pievieno 30 % izšķīdušu saharozi (300 g uz 1 000 ml); tad aizpilda mērkolbu ar augstākajā pakāpē tīru ūdeni līdz atzīmei.

Visbeidzot, barotņu šķīdumu iepilda 0,5 l *Schott* kolbās un 20 minūtes sterilizē autoklāvā 121 °C temperatūrā.

Šādi iegūtu desmitkārtīgi koncentrētu modificētu barotņu šķīdumu sterilu ledusskapī (5–10 °C) var glabāt trīs mēnešus.

▼M7

3. papildinājums

IZEJKULTŪRAS UZTURĒŠANA

Šajā 3. papildinājumā ir aprakstīta izejkultūra ūdens divdīgļlapis *Myriophyllum spicatum* L ([1]), halorāgu dzimtas suga. Laikā no jūnija līdz augustam virs ūdens virsmas redzami neuzkrītoši balti rozā ziedi. Augi sakņojas zemē ar spēcīgu sakneņu sistēmu un ir sastopami visā ziemeļu puslodē eitrofiskos, bet nepiesārņotos stāvošos ūdeņos ar dubļainu substrātu un samērā augstu kalcija saturu. *Myriophyllum spicatum* dod priekšroku saldūdenim, bet tos var atrast arī iesāļā ūdenī.

Bezsedimentu izejkultūrai laboratorijas apstākļos ir vajadzīgi sterili augi. Sterili augi ir pieejami Vācijas *Umweltbundesamt* (Vācijas Federālā Vides aģentūra) ekotoksikoloģijas laboratorijā.

Testa organismus arī var sagatavot no nesteriliem augiem saskaņā ar *ASTM* apzīmējumu E 1913-04. Sk. turpmāk (citēts no *ASTM* Standarta norādījumiem) procedūra no lauka ievāktas *Myriophyllum sibiricum* audzēšanai:

> "Ja sākumam izmanto no lauka vāktus nesterilus augus, *M. sibiricum* atvases vāc rudenī. Atvases ievieto 20 l akvārijā, kas satur 5 cm sterilu sedimentu, kuri ir pārklāti ar kvarca smiltīm vai, piemēram, *Turface*®, un 18 litrus reaģenta ūdens. 16 h dienā akvāriju apgādā ar skābekli un uztur 15 °C temperatūru un plūsmas ātrumu 200–300 μmol m^{-2} s^{-1}. Augu kultūru akvārijā var saglabāt kā augu rezerves avotu gadījumiem, kur sterilās augu kultūras iet bojā audzēšanas skapja mehāniskas atteices, kontaminācijas vai cita iemesla dēļ. Akvārijā audzētie augi nav sterili, un sterilas kultūras nevar turēt partiju kultūraudzēšanas sistēmā. Lai kultūru sterilizētu, augus izņem no akvārija un aptuveni 0,5 h skalo zem tekoša dejonizēta ūdens. Aseptiskos apstākļos laminārās gaisa plūsmas skapī augus dezinficē nepilnas 20 min. (līdz lielākā daļa auga audu izbalē un zaļa ir vēl tikai auga galotne) 3 % (tilpuma) nātrija hipohlorīta šķīdumā, kas satur 0,01 % piemērota virsmaktīvā aģenta. Dezinfekcijas līdzekli un augu materiālu sakrata. Segmentus ar vairākiem mezgliem pārvieto sterilās kultūraudzēšanas mēģenēs, kas satur 45 ml sterilizētas modificētas *Andrews* barotnes, un aizvāko ar vienkāršiem kultūraudzēšanas mēģeņu aizbāžņiem. Katrā testa kamerā ievieto tikai vienu augu segmentu. Kultivēšanas trauka aizbāzni nostiprina ar laboratorijas hermetizētāju. Kad ir izveidota sterila kultūra, tādi augu segmenti, kuros ir vairāki mezgli, ik pēc desmit līdz divpadsmit dienām jāievieto jaunās testa kamerās, kas satur svaigu šķidro barotni. To pierādot ar kultūru audzēšanu uz agara platēm, augiem jābūt steriliem un, pirms var sākt testu, tiem jābūt bijušiem steriliem astoņas nedēļas."

Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē sēnīšu un baktēriju augšanu), jebkādi materiāli un šķīdumi jāsagatavo un audzēšana jāveic sterilos apstākļos. Visus šķidrumus, kā arī aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē. Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h sakarsēta gaisa apstrādi (210 °C) vai 20 min autoklavēšanu 121 °C temperatūrā. Turklāt pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

Izejkultūras samazinātā apgaismojumā un temperatūrā (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) bez nepieciešamības tās atjaunot var turēt ilgākus laikposmus.

([1]) Carl von Linné (* May, 23th, 1707 in Råshult /Älmhult; † January, 10th, 1778 in Uppsala).

▼M7

Myriophyllum augšanas barotnei jābūt tādai pašai, kāda izmantota testēšanā, bet izejkultūrām var izmantot citu barības vielām bagātu barotni.

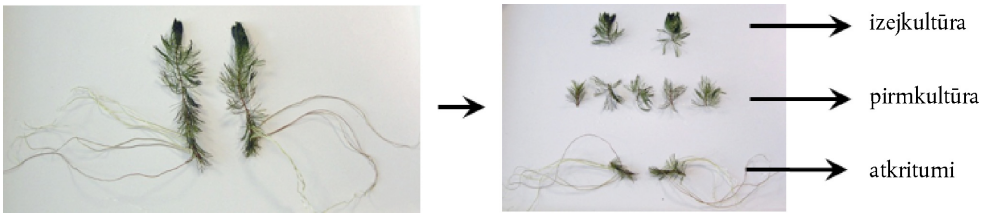
Augu segmentus, ievērojot sterilitāti, sadala pa vairākām 500 ml Erlenmeijera vai/un 2000 ml Fernbaha kolbām, katru attiecīgi piepilda ar aptuveni 450 un 1 000 ml modificētas *Andrews* barotnes. Tad kolbas, ievērojot sterilitāti, noslēdz ar celulozes aizbāzni.

Turklāt tieši pirms lietošanas aprīkojums uz sterila darbgalda viscaur jāapstrādā ar liesmu. Atkarībā no to skaita un apjoma augus aptuveni ik pēc trīs nedēļām pārvieto uz svaigu barotni.

Šai atjaunotajai kultūrai var izmantot galotnes, kā arī stublāja vidusdaļas segmentus. Ievietoto augu (vai augu segmentu) skaits un lielums ir atkarīgs no tā, cik augu nepieciešams. Piemēram, vienā Fernbaha kolbā var ievietot piecus dzinumu segmentus, un vienā Erlenmeijera kolbā — trīs dzinumu segmentus, katru 5 cm garu. Jāizmet jebkādas daļas ar sakni, ziedošas, nedzīvas vai citādā veidā uzkrītošas daļas.

1. attēls

Augu griešana izejkultūrai un pirmkultūrai pēc 3 nedēļu ilgas kultivācijas.



Augi 500 ml Erlenmeijera un 2 000 ml Fernbaha kolbās jāaudzē dzesēšanas inkubatorā ar 20 ± 2 °C temperatūru un nepārtrauktu apgaismojumu apmēram 100–150 µE m^{-2} s^{-1} vai 6 000–9 000 Lux (ko izstaro kameras apgaismojums ar krāsas temperatūru "silti balta gaisma").

2. attēls

Augu kultivēšana dzesēšanas inkubatorā ar kameras apgaismojumu.



Jāizmanto ķīmiski tīri (ar skābi mazgāti) un sterili stikla kultivēšanas trauki un aseptiskas apstrādes metodes. Ja izejkultūra ir kontaminēta, piemēram, ar aļģēm, sēnītēm un/vai baktērijām, ir jāsagatavo jauna kultūra vai šī viena kultūra jāatjaunina ar izejkultūru no citas laboratorijas.

▼M7

4. papildinājums

PIRMKULTŪRAS UZTURĒŠANA UN TESTA ORGANISMA SAGATAVOŠANA TESTĒŠANAI

Lai iegūtu pirmkultūru, izejkultūras dzinumus sasmalcina segmentos ar diviem mieturiem katrā; segmentus ievieto Fernbaha kolbās, kas pildītas ar modificētu *Andrews* barotni (ar 3 % saharozes). Katra kolba var saturēt līdz pat 50 dzinumu segmentiem. Tomēr jāraugās, lai segmenti būtu dzīvotspējīgi un tiem nebūtu sakņu un sānu zaru vai to aizmetņu (sk. 1. att. 3. papildinājumā).

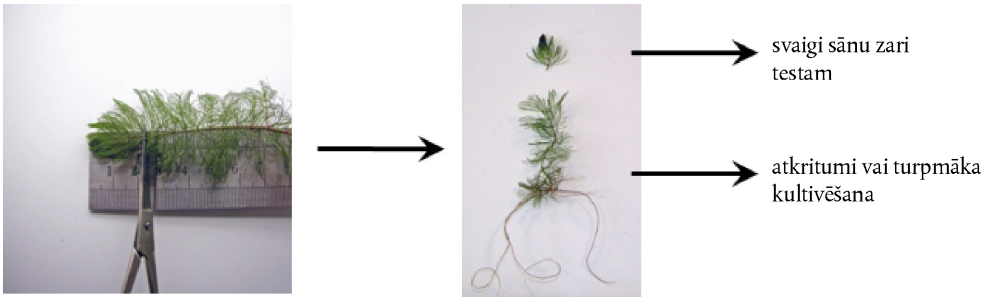
Pirmkultūras organismus sterilos apstākļos vides kamerā ar secīgām 16/8 h gaismas/tumsas fāzēm audzē 14 līdz 21 dienu. Gaismas intensitāti izraugās diapazonā 100–150 μE m^{-2} s^{-1}. Temperatūrai testa traukos jābūt 23 ± 2 °C.

Tā kā modificēta *Andrews* barotne satur saharozi (kas stimulē aļģu, sēnīšu un baktēriju augšanu), testējamās ķimikālijas šķīdumi jāsagatavo un audzēšana jāveic sterilos apstākļos. Visus šķidrumus, kā arī aprīkojumu pirms lietošanas sterilizē Sterilizāciju veic, izmantojot 4 h ilgu apstrādi ar sakarsētu gaisu (210 °C) vai 20 min autoklavēšanu 121 °C temperatūrā. Turklāt pirms lietošanas visas kolbas, traukus, kausus utt. un citu aprīkojumu uz sterila darbagalda apstrādā ar liesmu.

Dzinumus, ievērojot sterilitāti, izņem no pirmkultūras kolbām, izraugoties iespējami viendabīgu materiālu. Katrai testēšanai vajadzīgi vismaz 60 testa organismi (testēšanai ar astoņām testējamās ķimikālijas koncentrācijām). Testēšanai ņem svaigus sānu zarus no pirmkultūras, tos saīsina līdz 2,5 cm no pamatnes (ko mēra ar mērlineālu) un ievieto vārglāzē, kurā ir sterila modificēta *Andrews* barotne. Šos svaigos sānu zarus var izmantot *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testam.

2. attēls

Augu griešana no pirmkultūras *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testam.



▼M7

C.51. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ŪDENS–SEDIMENTU TOKSISKUMA TESTS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO testēšanas norādījumiem 239 (2014. gads). Testēšanas metodes ir pieejamas sugai *Lemna* (peldošs ūdensaugs, viendīgļlapis) (1), un aļģu sugām (2). Šīs metodes parasti izmanto, lai ģenerētu datus nolūkā novērst risku, ko testējamās ķimikālijas, jo īpaši herbicidālas iedarbības ķimikālijas, rada ūdensaugu sugām, kas nav mērķsugas. Tomēr dažos gadījumos var būt nepieciešami dati par papildu makrofītu sugām. Pēc Vides toksiskuma un ķīmijas apvienības (*SETAC*) semināra par ūdens makrofītu riska novērtējumu attiecībā uz pesticīdiem (*AMRAP*) nesen publicēti norādījumi ierosina, ka tad, ja zināms, ka *Lemna* un aļģes nav jutīgi pret iedarbības veidu, vai ja bažas rada tas, ka viela sadaloties nokļūst sedimentos, kā rezultātā notiek ekspozīcija caur sakņu sistēmu (3), attiecībā uz testējamām ķimikālijām var būt nepieciešami dati par sakņotām makrofītu sugām. Balstoties uz pašreizējo izpratni un pieredzi, gadījumiem, kad ir vajadzīgi dati par zem ūdens augošām, sakņotu divdīgļlapju sugām (4), (5), (6), kā vēlamo sugu izraudzījās *Myriophyllum* spp. Šis tests neaizstāj citus toksiskuma ūdenī testus; tas drīzāk papildina tos tādējādi, ka iespējams pilnīgāk novērtēt bīstamību un risku attiecībā uz ūdensaugiem. *Myriophyllum spicatum* ūdens–sedimentu testēšanas metode papildina *Myriophyllum spicatum* bezsedimentu toksiskuma testu (7).

2. Šis dokuments apraksta testēšanas metodi, kas ļauj novērtēt testējamās ķimikālijas ietekmi uz sakņotu ūdensaugu sugu *Myriophyllum spicatum*, kas aug ūdens–sedimentu sistēmā. Testēšanas metode ir daļēji balstīta uz esošajām metodēm (1), (2), (8), un tajā ņemti vērā neseni pētījumi, kas saistīti ar novērtējumu par risku ūdensaugiem (3). Ūdens–sedimentu metode ir validēta starptautiskā starplaboratoriju salīdzināšanā, kas statiskos apstākļos veikta ar *Myriophyllum* sugas augiem, kuri eksponēti testējamai ķimikālijai, to ievadot ar vertikālā ūdens slāņa starpniecību (9). Tomēr testa sistēmu var viegli pielāgot, lai nodrošinātu ekspozīciju caur piesātinātiem sedimentiem vai ekspozīciju ūdens fāzē ar pusstatiskiem vai pulsveidīgu devu scenārijiem, lai gan šiem scenārijiem nav veikta starplaboratoriju salīdzināšana. Turklāt vispārīgo metodi var izmantot citām sakņotām zem ūdens un virs ūdens augošām sugām, tostarp citām *Myriophyllum* sugām (piemēram, *Myriophyllum aquaticum*) un *Glyceria maxima* (10). Alternatīvām sugām var būt nepieciešams modificēt testa nosacījumus, plānu un ilgumu. Konkrēti, vēl jāstrādā, lai noteiktu piemērotas procedūras attiecībā uz *Myriophyllum aquaticum*. Šajā testēšanas metodē šie varianti nav sīki izklāstīti, tā apraksta standarta pieeju *Myriophyllum spicatum* ekspozīcijai statiskā sistēmā, izmantojot ūdens fāzi.

3. Šī testēšanas metode attiecas uz vielām, attiecībā uz kurām tā ir validēta, (sīkāku informāciju sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumā (9)), uz preparātiem vai zināmiem maisījumiem. *Myriophyllum* testu var veikt, lai izpildītu 1. līmeņa datu prasību, kas izriet no tā, ka testējamā ķimikālija sadalīšanās ceļā var nokļūt sedimentos, vai no jautājumiem par iedarbības veidu vai selektivitāti. Tāpat *Myriophyllum* laboratorijas tests var būt nepieciešams kā elements augstāka līmeņa stratēģijā, lai kliedētu bažas par risku attiecībā uz ūdensaugiem. Ekspozīcijas ceļš (t. i., ūdens vai sedimenti) būs atkarīgs no testa veikšanas konkrētā iemesla. Pirms testēšanas metodi izmantot, lai regulatīvā nolūkā testētu maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam nolūkam pietiekamus rezultātus, un, ja var, tad kāpēc. Šādi apsvērumi nav vajadzīgi, ja attiecībā uz maisījuma testēšanu pastāv regulatīva prasība.

▼M7

TESTA PRINCIPS

4. Tests ir paredzēts, lai novērtētu ar ķimikāliju saistīto ietekmi uz veģetatīvo augšanu *Myriophyllum*, kas aug standartizētās barotnēs (ūdens, sedimenti un barības vielas). Šim nolūkam veselas, neziedošas dzinumu galotnes ievieto standartizētos, mākslīgos sedimentos, kas, lai augi pietiekami augtu, ir papildināti ar papildu barības vielām, un pēc tam tur Smārta un Barko barotnē (1. papildinājums). Pēc iejušanās perioda, kas paredzēts, lai izveidotos saknes, augus eksponē vairākām testējamajām koncentrācijām, kas pievienotas vertikālajam ūdens slānim. Ekspozīciju ar sedimentiem arī var simulēt, mākslīgos sedimentus piesātinot ar testējamo ķimikāliju un pārstādot augus šajos piesātinātajos sedimentos. Abos gadījumos pēc tam augus kontrolētos vides apstākļos tur 14 dienas. Ietekmi uz augšanu nosaka, kvantitatīvi novērojot dzinumu garumu, svaigsvaru un saussvaru, kā arī kvalitatīvi novērojot tādus simptomus kā hloroze, nekroze vai augšanas novirze.

5. Lai ar ķimikāliju saistīto ietekmi noteiktu kvantitatīvi, augšanu testa šķīdumos salīdzina ar kontrolaugu augšanu un nosaka koncentrāciju, kas rada noteiktu x % augšanas inhibēšanās, to izsakot kā EC_x; "x" atkarībā no regulatīvās prasības var būt jebkura vērtība, piemēram, EC_{10}, EC_{20} un EC_{50}. Jānorāda, ka EC_{10} un EC_{20} vērtību aplēses ir uzticamas un piemērotas tikai testos, kuros variācijas koeficienti kontrolaugiem ir zemāki par lēsto ietekmes līmeni, t. i., lai varētu stabili novērtēt EC_{20}, variācijas koeficientiem jābūt < 20 %.

6. Jānosaka neapstrādāto un apstrādāto augu vidējais īpatnējais augšanas rādītājs (aprēķina, novērtējot dzinumu garumu, dzinumu svaigsvaru un dzinumu saussvaru) un pieaugums (aprēķina no dzinumu garuma, dzinumu svaigsvara un dzinumu saussvara pieauguma). Pēc tam īpatnējo augšanas rādītāju (r) un pieaugumu (y) izmanto, lai noteiktu $E_r\ C_x$ (piemēram, $E_r\ C_{10}$, $E_r\ C_{20}$, $E_r\ C_{50}$) un attiecīgi $E_y\ C_x$ (piemēram, E_yC_{10}, $E_y\ C_{20}$, $E_y\ C_{50}$).

7. Ja nepieciešams, zemāko novērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) no vidējā īpatnējā augšanas rādītāja un pieauguma aplēsēm var noteikt statistiski.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶIMIKĀLIJU

8. Ir jābūt pieejamai analītiskai metodei, kas ir pietiekami jutīga, lai noteiktu testējamās ķimikālijas daudzumu testa barotnē.

9. Informācijā par testējamo ķimikāliju, kas var noderēt, lai izstrādātu testa nosacījumus, ietver tās strukturālo formulu, sastāvu (ja tā ir vairākkomponentu viela, *UVCB*, maisījums vai preparāts), tīrību un piemaisījumus, šķīdību ūdenī, stabilitāti ūdenī un gaismā, skābes disociācijas konstanti (pK_a), oktanola-ūdens sadalīšanās koeficientu (K_{ow}), ja pieejams, K_d attiecībā uz sedimentiem, tvaika spiedienu un bionoārdāmība. Šķīdību ūdenī un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai ir iespējami būtiski testējamās ķimikālijas zudumi testa periodā. Ja paredzami testējamās ķimikāliju zudumi, šiem zudumiem jānosaka daudzums un jādokumentē turpmākās darbības, lai zudumus kontrolētu. Ja informācija par testējamās(-o) ķimikālijas(-u) šķīdību un stabilitāti ir neskaidra, ieteicams šīs īpašības novērtēt testa apstākļos, t. i., tādā augšanas vidē, temperatūrā, apgaismojuma režīmā, ko izmanto testā. *Piezīme*: ja pārbauda gaismatkarīgus peroksidāzes herbicīdus, jāizmanto laboratorijas apgaismojums ar dabiskajai saules gaismai līdzvērtīgu solāro ultravioleto gaismu.

▼M7

10. Ja nepieciešams, testa barotnē jāmēra un jāpielāgo pH. Testa barotnes pH kontrole ir īpaši svarīga, piemēram, testējot metālus vai ķimikālijas, kas ir hidrolītiski nestabili. Papildu norādījumi par tādu ķimikāliju testēšanu, kuru testēšanu apgrūtina to fizikālķīmiskās īpašības, sniegti ESAO Norādījumu dokumentā (11).

TESTA DERĪGUMS

11. Lai testa rezultāti būtu derīgi, kontrolaugu vidējam kopējam dzinumu garumam un vidējam kopējam dzinumu svaigsvaram testa ekspozīcijas fāzes laikā vismaz jādivkāršojas. Turklāt kontrolaugi nedrīkst uzrādīt nekādus vizuālus hlorozes simptomus, un tiem jābūt acīmredzami nekontaminētiem ar citiem organismiem, piemēram, aļģēm un/vai baktēriju plēvēm uz augiem, uz sedimentu virsmas un testa barotnē.

12. Kontrolkultūru replikātos vidējais variācijas koeficients pieaugumam, kura pamatā ir dzinumu svaigsvara mērījumi (t. i., no testa sākuma līdz beigām), nepārsniedz 35 %.

STANDARTĶIMIKĀLIJA

13. Standartķimikāliju(-as), piemēram, 3,5-dihlorfenols, ko izmanto starplaboratoriju salīdzināšanā (9), laika gaitā regulāri jātestē, lai pārbaudītu testa procedūras veiktspēju. Starplaboratoriju salīdzināšanas dati liecina, ka 3,5-DCP vidējās EC_{50} vērtības attiecībā uz dažādiem atkarīgajiem mainīgajiem bija no 4,7 līdz 6,1 mg/l (informācijai sk. starplaboratoriju salīdzināšanas ziņojumu par paredzamo ticamības intervālu ap šīm vērtībām). Standartķimikāliju ieteicams testēt vismaz divas reizes gadā vai, ja testus veic retāk, vienlaikus ar testējamās ķimikālijas toksiskuma noteikšanu. Paredzamo EC_{50} vērtību ceļvedis attiecībā uz 3,5-DCP sniegts Starptautiskās starplaboratoriju salīdzināšanas Statistikas ziņojumā (9).

METODES APRAKSTS

Testēšanas aprīkojums

14. Tests jāveic kontrolētos vides apstākļos, t. i., audzēšanas kamerā, audzēšanas telpā vai laboratorijā ar kontrolējamu dienas garumu, apgaismojumu un temperatūru (sk. iedaļu "Testa nosacījumi", 56.–58. punkts). Izejkultūras jāglabā atsevišķi no testa traukiem.

15. Pētījums jāveic, izmantojot stikla testa traukus, piemēram, akvārijus vai mērglāzes; parasti izmanto 2 l stikla mērglāzes (augstums apmēram 24 cm, diametrs 11 cm). Tomēr citi (t. i., lielāki) trauki var būt piemēroti ar nosacījumu, ka ir pietiekami liels ūdens dziļums, lai būtu iespējama neierobežota augšana un augi visu testa laiku atrastos zem ūdens.

16. Par tvertnēm augu stādīšanai sedimentos var izmantot plastmasas vai stikla augu podus (diametrs apmēram 9 cm, augstums 8 cm un tilpums 500 ml). Var izmantot arī stikla mērglāzes, un dažos gadījumos tās ir pat vēlamas (piemēram, testējot hidrofobas ķimikālijas vai ķimikālijas ar augstu K_{ow}).

17. Poda/vārglāzes izmērs jāizraugās, ņemot vērā izraudzītos testa traukus un vēlamo testa plānu (sk. turpmāk). Ja izmanto testa plānu A (katrā podā viens dzinums, vienā traukā trīs podi), var būt vajadzīgi mazāki podiņi vai lielāki trauki. Ja izmanto testa plānu B (katrā podā trīs dzinumi, vienā traukā viens pods), norādīto podu un trauku izmēriem vajadzētu pietikt. Visos gadījumos minimālajam virsējā ūdens dziļumam jābūt 12 cm virs nosēdumu virskārtas un ir jāreģistrē nosēdumu virsmas laukuma/tilpuma attiecība pret ūdens virsmas laukumu/tilpumu.

▼M7

Testa organisms

18. Šajā testēšanas metodē aprakstītās vispārīgās pieejas var izmantot, lai testētu dažādas ūdensaugu sugas. Tomēr šajā testēšanas metodē aprakstītie nosacījumi ir pielāgoti vārpainās daudzlapes *Myriophyllum spicatum* testēšanai. Šī suga pieder divdīgļlapju dzimtai *Haloragaceae*.

19. *Myriophyllum spicatum* (vārpainā daudzlape) ir zem ūdens augoša, sakņota suga, kas pacieš plaša diapazona apstākļus un ir sastopama gan statiskās, gan tekošās ūdenstilpnēs. *M. spicatum* ir daudzgadīgs augs, kas ziemā līdz saknēm iet bojā. Augi parasti zied un brīvi izplata sēklas, lai gan jaunas kolonijas galvenokārt vairojas veģetatīvi ar žākles aizmetņiem vai stublāju fragmentiem, kas atdalās dabiski vai pēc mehāniskas iejaukšanās.

Testa organisma kultivēšana

20. Augus var iegūt no dabīgām populācijām vai no ūdensaugu piegādātājiem. Abos gadījumos augu avots jādokumentē un jāpārbauda sugu identitāte. Liela uzmanība jāpievērš tam, lai nodrošinātu, ka, vācot *Myriophyllum spicatum* no lauka, tiek iegūtas pareizās sugas, jo īpaši reģionos, kur augi var sakrustoties ar citām *Myriophyllum* sugām. Šaubu gadījumā ieteicams izmantot verificētas laboratoriju kultūras no zināmiem avotiem. Šajā testā nedrīkst lietot augus, kas bijuši pakļauti jebkādai ķīmiskai kontaminācijai vai ir savākti no vietām, par kurām zināms, ka tās ir kontaminētas.

21. Reģionos, kur *M. spicatum* ziemas mēnešos nav viegli pieejama, var būt nepieciešams izejkultūras ilgstoši uzturēt siltumnīcas vai laboratorijas apstākļos. Izejkultūras jāuztur testa nosacījumiem līdzīgos apstākļos, lai gan starojumu un temperatūru var samazināt, lai samazinātu kultūras uzturēšanas biežumu (piemēram, ja *Myriophyllum* testi uz laiku netiek plānoti). Ieteicams izmantot lielākus akvārijus un augu podus nekā testos, lai tiem būtu telpa izplatīties. Sedimentu un ūdens–barotnes sastāvam jābūt tādam pašam kā testos izmantojamiem, kaut gan sedimentu mēslošanai var izmantot alternatīvas metodes (piemēram, izmantot lēnas iedarbības komerciālu mēslojuma preparātus).

22. Izejaugiem jābūt bez redzamas kontaminācijas, ko radījuši citi organismi, tostarp gliemeži, šķiedrveida aļģes, sēnītes un insekti, piemēram, kožu olas vai kāpuri *Paraponyx stratiotata* un smecernieku dzimtas kāpuri vai pieaugušie insekti *Eubrychius velutus*. Augu materiāls var būt jāskalo saldūdenī, lai likvidētu redzamu kontamināciju. Turklāt jāpūlas samazināt vienšūnu aļģu un baktēriju kontaminācijas attīstīšanās, kaut gan augu materiālam nav jābūt pilnīgi sterilam. Izejkultūras jāuzrauga un, cik vajadzīgs, jāpārstāda, lai novērstu aļģu un baktēriju kontaminācijas attīstību. Ja kontaminācija ar aļģēm vai baktērijām kļūst problemātiska, var būt lietderīgi izejkultūras aerēt.

23. Visos gadījumos, pirms augus izmantot testā, tos pietiekami ilgu laiku (t. i., > 2 nedēļas) audzē/aklimatizē apstākļos, kas ir līdzīgi, bet ne obligāti identiski tiem, ko izmanto testā.

24. Testā nedrīkst izmantot ziedošas izejkultūras, jo veģetatīvas augšanas temps ziedēšanas laikā un pēc tās parasti samazinās.

▼M7

Sedimenti

25. Šajā testā ir ieteicams izmantot sedimentus, kas pagatavoti uz tādu mākslīgo sedimentu bāzes, kas izmantoti šā pielikuma C.28. nodaļā (8). Sedimentus sagatavo, kā aprakstīts TM C.28., izņemot barības vielu pievienošanu, kas aprakstīta turpmāk:

a) 4–5 % kūdras (saussvars pēc 2 ± 0,5 % organiskā oglekļa) ar pH, kas iespējami tuvāks 5,5 līdz 6,0; ir svarīgi izmantot smalki samaltu pulverveida kūdru (vēlams, daļiņu lielums < 1 mm) un tikai gaisā kaltētu.

b) 20 % (saussvars) kaolīna māli (kaolinīta saturs vēlams virs 30 %).

c) 75–76 % (saussvars) kvarca smiltis (smalkas smiltis pārsvarā ar vairāk nekā 50 % daļiņu no 50 līdz 200 μm).

d) Pievieno ūdens šķīduma barotni, lai sedimentu gala partija saturētu 200 mg amonija hlorīda un nātrija fosfāta uz kilogramu sausu nosēdumu un mitruma saturs galīgajā maisījumā būtu 30–50 %.

e) Pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu ($CaCO_3$), lai galīgā sedimentu maisījuma pH būtu pielāgots līdz 7,0 ± 0,5.

26. Kūdras, kaolīna māla un smilts avotam jābūt zināmam un dokumentētam. Ja izcelsme nav zināma vai rada zināmas bažas, attiecīgie komponenti jāpārbauda, vai tajos nav ķīmiskas kontaminācijas (piemēram, smagie metāli, hlororganiskie savienojumi, fosfora savienojumi).

27. Pirms sedimentos rūpīgi iejauc ūdens un barības vielu šķīdumu, sedimentu sausās sastāvdaļas sajauc līdz homogenitātei. Mitros sedimentus pagatavo vismaz divas dienas pirms lietošanas, lai nodrošinātu, ka kūdra viscaur izmirkst un lai pēc barotnes uzliešanas uz sedimentiem virspusē neuzpeldētu hidrofobas kūdras daļiņas; pirms lietošanas mitros sedimentus var glabāt tumsā.

28. Testam sedimentus ievieto piemērota izmēra tvertnēs, piemēram, augu podos ar tādu diametru, lai tie ietilptu stikla traukos (sedimentu virsmai jābūt apmēram 70 % vai vairāk no trauka virsmas). Ja tvertnei apakšā ir caurumi, gabals filtrpapīra tvertnes apakšā palīdzēs sedimentus noturēt tvertnē. Podus piepilda ar sedimentiem tā, lai sedimentu virsma būtu līdzena, pēc tam tos pārklājot ar kārtiņu (~ 2–3 mm) inerta materiāla, piemēram, smiltīm, smalku dārzkopības granti (vai sasmalcinātiem koraļļiem), lai sedimenti paliktu attiecīgajā vietā.

Testa barotne

29. *Myriophyllum spicatum* audzēšanai un testēšanai ir ieteicama Smārta un Barko barotne (12). Šīs barotnes pagatavošana ir aprakstīta 1. papildinājumā. Lai augi optimāli augtu, testa sākumā barotnes pH (ūdens fāzei) jābūt no 7,5 līdz 8,0.

Eksperimentālais plāns

30. Testā jāiekļauj vismaz seši replikātu testa trauki neapstrādātai kontrolei un vismaz četri replikātu testa trauki katram no vismaz pieciem koncentrācijas līmeņiem.

31. Ja *NOEC* noteikšana nav nepieciešama, testa plānu var mainīt, palielinot koncentrāciju skaitu un samazinot vienas koncentrācijas replikātu skaitu.

▼M7

32. Katrs tests trauks ir replikāts, kurā ir trīs dzinumi. Ir divas iespējas, kā katrā testa traukā audzēt trīs dzinumus:

— Plāns A: viens dzinums katrā podā un trīs podi vienā traukā.

— Plāns B: trīs dzinumi katrā podā un viens pods vienā traukā.

— Alternatīvs testa plāns ar vienu dzinumu vienā podā uz testa trauku ir pieņemams, ja replikātus pielāgo pēc vajadzības, lai panāktu atbilstību paredzētajiem derīguma kritērijiem.

33. Atsevišķus testa traukus randomizēti sadala pa apstrādes grupām. Testa trauku atrašanās vietas testa zonā jāplāno randomizēti, lai samazinātu gaismas intensitātes vai temperatūras telpisko atšķirību ietekmi.

Testējamo ķimikāliju koncentrācijas un kontroles grupas

34. Koncentrācijām parasti jābūt ģeometriskā progresijā; atstatuma koeficients starp testējamajām koncentrācijām nedrīkst pārsniegt 3,2. Piemērotas testējamās koncentrācijas palīdzēs izraudzīties diapazona noteikšanas testā iegūtas iepriekšējas zināšanas par testējamās ķimikālijas toksiskumu.

35. Nosakot EC_x, attiecīgu ticamības līmeni var nodrošināt, ja testējamās koncentrācijas ir tādas, ka vērtība EC_x atrodas starp tām. Piemēram, ja aprēķina EC_{50}, augstākajai testējamajai koncentrācijai jāpārsniedz vērtība EC_{50}. Ja vērtība EC_{50} neiekļaujas testējamo koncentrāciju diapazonā, saistītie ticamības intervāli būs lieli, un var nebūt iespējams novērtēt modeļa statistisko piemērotību. Precīzāku ticamības intervālu attiecībā uz EC_x vērtību būs iespējams iegūt, izmantojot vairāk testējamo koncentrāciju.

36. Lai noteiktu *LOEC*/*NOEC* (izvēles beigupunkts), zemākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami zemai, lai augšana būtiski neatšķirtos no kontrolaugu augšanas. Turklāt augstākajai testējamajai koncentrācijai jābūt pietiekami augstai, lai augšana būtu ievērojami zemāka nekā kontrolē. Lielāka replikātu skaita izmantošana uzlabos nenovērojamas ietekmes koncentrācijas/*ANOVA* plāna statistisko jaudu.

Robežtests

37. Ja diapazona noteikšanas tests liecina, ka testējamai ķimikālijai koncentrācijā līdz 100 mg/l, līdz tās šķīdības robežai testa barotnē, vai — preparāta gadījumā — līdz izkliedēšanās robežai nav nelabvēlīgas ietekmes, ar 100 mg/l, ar šķīdības robežai līdzvērtīgu koncentrāciju vai ar 1 000 mg/kg sausu sedimentu var veikt robežtestu, lai būtu vieglāk salīdzināt kontroles grupas un vienas apstrādes grupas atbildreakciju. Šajā testā ir jāievēro devas–atbildreakcijas standarttesta vispārīgie principi, izņemot to, ka minimālo replikātu skaitu ieteikts palielināt līdz sešiem testa traukiem uz kontroli un koncentrāciju. Augšanu kontroles un apstrādes grupā var analizēt, izmantojot statistisku testu, kurā salīdzina vidējos rādītājus, piemēram, Stjūdenta t testu.

Testa šķīdumi

38. Testa šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot izejšķīdumu, kas pagatavots, izšķīdinot vai izkliedējot testējamo ķimikāliju Smārta un Barko barotnē, izmantojot demineralizētu (t. i., destilētu vai dejonizētu) ūdeni (sk. 1. papildinājumu).

▼M7

39. Augstākā testējamajai koncentrācija parasti nedrīkst pārsniegt testējamās ķimikālijas šķīdību ūdenī vai, preparātu gadījumā, izkliedējamību testa apstākļos.

40. Attiecībā uz testējamām ķimikālijām, kas slikti šķīst ūdenī, var būt nepieciešams sagatavot koncentrētu izejšķīdumu vai dispersiju, izmantojot organisko šķīdinātāju vai izkliedētājvielu, lai atvieglotu precīzu testējamās ķimikālijas daudzumu pievienošanu testa barotnei un veicinātu tās dispersiju un izšķīšanu. Jādara viss iespējamais, lai šādi šķīdinātāji vai izkliedētājvielas nebūtu jāizmanto. Papildu šķīdinātāju vai izkliedētājvielu izmantošana nedrīkst radīt fitotoksiskumu. Piemēram, parasti izmanto šķīdinātājus, kas neizraisa fitotoksiskumu koncentrācijās līdz 100 µl/l, tostarp acetonu un dimetilformamīdu. Ja izmanto šķīdinātāju vai izkliedētājvielu, tās gala koncentrācija jāatspoguļo ziņojumā un jāsaglabā minimāla (≤ 100 µl/l). Šādos apstākļos visām apstrādēm un (šķīdinātāja) kontrolēm jāsatur tā pati šķīdinātāja vai izkliedētājvielas koncentrācija. Testa plānā iekļauj arī neapstrādātus kontroles replikātus, kas nesatur šķīdinātāju vai izkliedētājvielu. Papildu norādījumi par izkliedētājvielu izmantošanu doti ESAO Norādījumu dokumentā (11).

TESTA PROCEDŪRA

41. Testa procedūra atšķiras atkarībā no testējamās ķimikālijas ievadīšanas ceļa (t. i., ūdens vai sedimentu fāzē). Lai informēti izvēlētos testā izmantoto ekspozīcijas režīmu (t. i., statisku sistēmu vai statiskas atjaunošanas sistēmu, piesātināta ūdens sistēmu vai piesātinātu sedimentu sistēmu), jāņem vērā testējamās ķimikālijas iespējamā izturēšanās ūdens–sedimentu sistēmā. Piesātinātu sedimentu tests ir vēlamāks dažām ķimikālijām, attiecībā uz kurām paredzams, ka liela daļa sadalījumā pārvietosies uz sedimentiem.

Iejušanās fāze

42. Kultūraugiem nogriež veselīgas dzinumu galotnes/galus, proti, bez sānu dzinumiem, raugoties, lai dzinumu garums būtu 6 cm (± 1 cm). Testa plānam A (viens dzinums uz podu un trīs podi uz vienu trauku) katrā podā pa vienam iestāda atsevišķus dzinumu galus. Testa plānam B (trīs dzinumi uz podu un viens pods uz vienu trauku) četras līdz piecas dzinumu galotnes stāda katrā podā ar sedimentiem.

43. Abos gadījumos materiāls jāstāda papildu podos, lai testa sākumā varētu atlasīt vienādus augus, kā arī nodrošināt rezerves augus, ko izmantot sakņu augšanas pārbaudei tieši pirms apstrādes, un rezerves augus, ko ievākt dzinumu biomasas un garuma mērījumiem 0. dienā.

44. Dzinumus ievieto tā, ka aptuveni trīs cm, kas aptver vismaz divus mezglus, ir zem sedimentu virsmas.

45. Podus pēc tam novieto testa traukos, kuros ir tādi paši vides apstākļi kā ekspozīcijas fāzē, un septiņas dienas tur Smārta un Barko barotnē, lai ierosinātu sakņu attīstību.

46. Pēc šā laika vairāki augi rezerves podos jāizņem sakņu augšanas pārbaudei. Ja sakņu augšana nav redzama (t. i., nav redzami sakņu gali), iejušanās fāze jāpagarina, līdz sakņu augšana ir redzama. Šis solis ir ieteicams, lai nodrošinātu, ka augi testa sākumā aktīvi aug.

▼M7

Viendabīga augu materiāla atlase

47. Podus, kas izraudzīti tā, lai būtu vienādi, testa plānam A (viens dzinums uz podu un trīs podi uz vienu trauku) izraugās pirms testa sākšanas. Testa plānam B (trīs dzinumi uz podu un viens pods uz vienu trauku) pārpalikušos augus noņem, atstājot trīs augus, kas ir vienāda lieluma un izskata.

Ekspozīcija, izmantojot ūdens fāzi

48. Podus, kas izraudzīti tā, lai būtu vienādi, ievieto testa traukos, kā paredzēts eksperimenta plānā. Tad testa traukos pievieno Smārta un Barko barotni. Sedimentiem jāpaliek neuzjauktiem. Šim nolūkam barotni var pievienot caur piltuvi vai, kamēr barotni ielej testa traukos, sedimentus pārklāt ar plastmasas disku, disku tūlīt pēc tam noteikti noņemot. Vai arī augu podus var ievietot testa traukos pēc barotnes pievienošanas. Ja vajadzīgs, lai mazinātu iespējamo aļģu un baktēriju uzkrāšanos, abos gadījumos ekspozīcijas fāzes sākumā var izmantot svaigu barotni vai atļaut, ka visiem replikātiem izmanto atsevišķas sagatavotas testa šķīduma partijas.

49. Dzinumu garumu virs sedimentiem mēra vai nu pirms, vai pēc barotnes pievienošanas.

50. Attiecīgus testējamās ķimikālijas daudzumus var pievienot testa barotnei, pirms to pievieno testa traukiem. Vai arī testējamo ķimikāliju var pievienot barotnei pēc tam, kad to pievieno testa traukiem. Šajā gadījumā raugās, ka testējamā ķimikālija ir vienmērīgi sadalīta visā testa sistēmā, neuzjaucot sedimentus.

51. Visos gadījumos testa sākumā jāreģistrē testa barotnes izskats (piemēram, skaidra, duļķaina u. c.).

Ekspozīcija ar sedimentiem

52. Piesātinātus nosēdumus no izvēlētās koncentrācijas sagatavo, testējamās ķimikālijas šķīdumu pievienojot tieši svaigiem sedimentiem. Dejonizētā ūdenī izšķīdinātu testējamās ķimikālijas izejšķīdumu ar sedimentu preparātu sajauc ar velmēšanu, barības mikseri vai ar roku. Ja testējamā ķimikālija slikti šķīst ūdenī, to var izšķīdināt piemērotā organiskā šķīdinātājā (piemēram, heksāns, acetons vai hloroforms), raugoties, lai tā tilpums būtu iespējami mazs. Pēc tam šo šķīdumu sajauc ar ca. 10 g smalku kvarca smilšu uz vienu testa trauku. Šķīdinātājam ļauj iztvaikot, un pēc tam smiltis sajauc ar piemērotu daudzumu sedimentu uz testa vārglāzi. Testējamo ķimikāliju izšķīdināt, izkliedēt vai emulģēt drīkst tikai ar viegli iztvaikojošiem aģentiem. Jāpatur prātā, ka galīgajā sedimentu sagatavošanā jāņem vērā ar testējamo ķimikāliju piesātināto smilšu tilpums/svars (t. i., sedimenti tādēļ jāpagatavo ar mazāku smilšu daudzumu). Jāraugās, lai sedimentiem pievienotā testējamā ķimikālija sedimentos būtu sadalīta rūpīgi un vienmērīgi.

53. Piesātinātus sedimentus iepilda podos (kā aprakstīts iepriekš). Augus, kas izvēlēti tā, lai tie būtu vienādi un tiem būtu pietiekama sakņu sistēma, no iejušanās fāzē izmantotajiem podiem izņem un, kā iepriekš aprakstīts, pārstāda piesātinātajos sedimentos.

54. Podus ievieto testa traukos, kā paredzēts eksperimentālajā plānā. Tad uzmanīgi pievieno Smārta un Barko barotni (piemēram, izmantojot piltuvi), raugoties, lai sedimenti netiktu uzjaukti. Dzinumu garumu virs sedimentiem mēra vai nu pirms, vai pēc barotnes pievienošanas.

▼M7

Ūdens līmeņu uzturēšana testa laikā

55. Jāreģistrē galīgais ūdens tilpums un jāatzīmē ūdens līmenis katrā testa traukā. Ja ūdens testa laikā iztvaiko par vairāk nekā 10 %, tā līmenis jāatjauno ar destilētu ūdeni. Ja nepieciešams, mērglāzes var brīvi pārklāt ar caurspīdīgu vāku, piemēram, caurspīdīgas plastmasas vāciņiem, lai samazinātu iztvaikošanu un kontamināciju ar aļģu sporām.

Testa nosacījumi

56. Izmanto silti un/vai vēsi baltu dienasgaismas apgaismojumu, lai nodrošinātu gaismas starojumu diapazonā apmēram 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, to mērot kā fotosintēzes aktīvo starojumu (400–700 nm) pie ūdens virsmas un izmantojot gaismas–tumsas attiecību 16:8 h. Jebkādas novirzes no izraudzītās apgaismojuma intensitātes testa zonā nedrīkst pārsniegt ± 15 %.

57. Temperatūra testa traukos ir 20 ± 2°C.

58. Testa laikā kontroles barotnes pH nedrīkst paaugstināties vairāk kā par 1,5 vienībām. Tomēr, ja var pierādīt, ka ir izpildīti iepriekš norādītie derīguma kritēriji, tests joprojām būs derīgs arī ar novirzēm, kas pārsniedz 1,5 vienības.

Testa ilgums

59. Ekspozīcijas periods ir 14 dienas.

Mērījumi un analītiskā noteikšana

60. Pēc iejušanās fāzes un tieši pirms apstrādes (t. i., 0. dienā) no pieciem randomizēti izraudzītiem podiem (plānā ar trim augiem uz podu) vai 15 podiem (plānā ar vienu augu uz podu) turpmāk aprakstītajai dzinumu garuma un svaigsvara un saussvara novērtēšanai ievāc rezerves augus.

61. Augiem ekspozīcijas fāzē, kā parādīts 1. tabulā, novērtē šādus parametrus.

— Pamatdzinumu garuma, sānu dzinumu skaita un sānu dzinumu garuma novērtējumus reģistrē vismaz ekspozīcijas perioda beigās (piemēram, 14. dienā).

— Vizuālos novērtējumus par augu veselību reģistrē vismaz trīs reizes ekspozīcijas perioda laikā (piemēram, 0., 7. un 14. dienā).

— Dzinumu svaigsvara un saussvara novērtējumus veic testa beigās (t. i., 14. dienā).

62. Dzinumu garumu nosaka ar mērlineālu. Ja ir attīstījušies sānu dzinumi, jāmēra arī to skaits un garums.

63. Augu veselības vizuālos novērtējumus veic, reģistrējot augu izskatu un testa barotnes vispārējo stāvokli. Jāatzīmē arī šādi novērojumi.

— Nekroze, hloroze vai citas krāsu izmaiņas, piemēram, pārmērīgs apsārtums salīdzinājumā ar kontrolaugiem.

— Radusies kontaminācija ar baktērijām vai aļģēm.

— Augšanas anomālijas, piemēram, augšanas aizture, mainīts internodālais garums, deformēti dzinumi/lapas, sānu dzinumu savairošanās, lapu zaudējums, šūnas iekšējā spiediena (turgora) zudums un stublāju sadrumstalotība.

▼M7

— Sakņu veselību vizuāli novērtē testa beigās, no saknēm rūpīgi nomazgājot sedimentus, lai varētu izdarīt sakņu sistēmas novērojumus. Ierosinātā skala augu novērtēšanai salīdzinājumā ar kontrolaugiem:

1) nav sakņu;

2) sakņu ir maz;

3) mērena sakņu attīstība;

4) ļoti laba sakņu attīstība, līdzīga kontrolaugiem.

64. Testa sākumā un beigās novērtē svaigsvaru, nogriežot dzinumus sedimentu līmenī un pirms svēršanas nosusinot sausus. Jāraugās, lai noņemtu sedimentu daļiņas, kas var pielipt pie dzinuma pamatnes. Dzinumu materiālu pēc tam ievietoto kaltēšanas krāsnī *ca*. 60 °C temperatūrā un kaltē līdz konstantai masai, pēc tam atkārtoti nosver un reģistrē saussvaru.

65. Kopsavilkums par minimālajiem bioloģiskajiem novērtējumiem, kas jāizdara visā testa laikā, ir sniegts 1. tabulā.

1. tabula

Novērtējuma plāns

Diena pēc apstrādes (*DAT*)	*Myriophyllum spicatum*			
	Dzinumu garums, sānu dzinumu garums un skaits	Dzinumu vizuālais novērtējums	Dzinumu svaigsvars un sausvars Sakņu vizuālais novērtējums	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: liecina, ka šajos gadījumos ir vajadzīgi novērtējumi.
—: liecina, ka mērījumi nav vajadzīgi.

Mērījumu biežums un analītiskā noteikšana

66. Vismaz reizi dienā (vai nepārtraukti, izmantojot datu reģistrētāju), jāreģistrē barotnes temperatūra rezerves traukā, ko tur tādos pašos apstākļos kā audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā.

67. Testa sākumā, vismaz reizi pētījuma laikā un pētījuma beigās visiem replikātu traukiem jāpārbauda testa barotnes pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija. Visos gadījumos mērījumi jāveic vienā un tajā pašā diennakts laikā. Ja visus replikātus katrai testējamajai koncentrācijai sagatavo ar vienu lielu šķīduma apjomu, ir pieņemami 0. dienā mērījumus katram lielapjoma šķīdumam izdarīt vienu reizi.

68. Audzēšanas kamerā, inkubatorā vai telpā punktos, kas ekvivalenti ūdens virsmas līmenim, jāmēra starojums. Mērījumi testa sākumā vai testa laikā jāizdara vismaz vienu reizi. Izmērīto vērtību ietekmēs gaismas noteikšanas un mērīšanas metode, jo īpaši sensora veids. Sfēriski sensori (kas reaģē uz

▼M7

gaismu no visiem leņķiem virs un zem mērīšanas plaknes) un kosinusa formas sensori (kas reaģē uz gaismu no visiem leņķiem virs mērīšanas plaknes) ir vēlamāki par vienvirziena sensoriem, un tie dos precīzākus šeit aprakstīto daudzleņķu gaismas avotu nolasījumus.

Testējamās ķimikālijas analītiskie mērījumi

69. Ar testējamās ķimikālijas koncentrāciju analītiskajiem mērījumiem jāpamato, ka testējamā ķimikālija ievadīta pareizi.

70. Ūdens paraugi testējamās ķimikālijas analīzei jāievāc neilgi pēc testa sākuma (t. i., dienā, kad ievadītas stabilas testējamās ķimikālijas, vai vienu stundu pēc nestabilu ķimikāliju ievadīšanas) un visām testējamajām koncentrācijām testa beigās.

71. Vismaz augstākajai testējamajai koncentrācijai testa sākumā un beigās jānosaka koncentrācija sedimentos un sedimentu poru ūdenī, ja vien nav zināms, ka testējamās ķimikālijas ūdenī ir stabilas (> 80 % no nominālā). Mērījumi sedimentos un poru ūdenī varētu nebūt nepieciešami, ja testējamo ķimikāliju sadalīšanās pa ūdeni un sedimentiem ir precīzi noskaidrota salīdzināmos apstākļos (piemēram, attiecībā uz sedimentu un ūdens attiecību, ievadīšanas metodi, sedimentu veidu) veiktā ūdens/sedimentu pētījumā.

72. Sedimentu paraugu ņemšana testa sākumā var izjaukt testa sistēmu. Tāpēc var būt vajadzīgi papildu apstrādāti testa trauki, lai atvieglotu analītisko noteikšanu, testu sākot un beidzot. Tāpat, ja tiek uzskatīts, ka nepieciešami starpposma novērtējumi, t. i., 7. dienā, un analīzēm vajadzīgi lieli sedimentu paraugi, ko nevar viegli paņemt testa sistēmā, analītiskā noteikšana jāveic, izmantojot papildu testa traukus, kas ir apstrādāti tādā pašā veidā kā tie, kas izmantoti bioloģiskajiem novērtējumiem.

73. Lai izolētu intersticiālo ūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g un 4 °C 30 minūtes. Tomēr, ja ir pierādīts, ka testējamā ķimikālija uz filtriem neabsorbējas, var būt pieņemama arī filtrēšana. Dažos gadījumos, ja paraugs ir pārāk mazs, koncentrāciju poru ūdenī analizēt var nebūt iespējams.

74. Pusstatiskos testos (t. i., ekspozīcija caur ūdens fāzi), kuros nav paredzams, ka testējamās(-o) ķimikālijas(u) koncentrācija, testa šķīdumus neatjaunojot, saglabāsies 20 % robežās no nominālās koncentrācijas, katrā atjaunošanas reizē testējamās ķimikālijas koncentrācijas jāanalizē, ņemot paraugus no izlietotajiem, kā arī no svaigi pagatavotajiem testa šķīdumiem.

75. Ja izmērītā sākotnējā testējamās ķimikālijas koncentrācija nav 20 % robežās no nominālās, bet ja var nodrošināt pietiekamus pierādījumus, ka sākotnējās koncentrācijas ir atkārtojamas un stabilas (t. i., 80–120 % robežās no sākotnējās koncentrācijas), ķīmisko noteikšanu var veikt tikai attiecībā uz augstāko un zemāko testējamo koncentrāciju.

76. Visos gadījumos testējamās ķimikālijas koncentrācijas noteikšana attiecībā uz katru testējamo koncentrāciju jāveic tikai vienā replikātu traukā. Katrai koncentrācijai analīžu nolūkā var arī apvienot visu replikātu testa šķīdumus.

77. Ja ir pierādījumi, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija visā testa laikā ir saglabājusies 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas, rezultātu analīzi un turpmāku beigupunktu atvasināšanu var balstīt uz nominālajām vai izmērītajām sākotnējām vērtībām.

▼M7

78. Šajos gadījumos ietekmi izraisošās koncentrācijas iegūst, balstoties uz nominālajām vai testa sākumā izmērītajām ūdens koncentrācijām.

79. Tomēr, ja ir pierādījumi, ka visā testa laikā koncentrācija ir samazinājusies (t. i., apstrādātajā nodalījumā nesaglabājas 20 % robežās no nominālās vai izmērītās sākotnējās koncentrācijas), rezultātu analīzei jābalstās uz ģeometrisko vidējo koncentrāciju iedarbības laikā vai uz modeļiem, kas apraksta testējamās ķimikālijas koncentrācijas samazināšanos šajā apstrādātajā nodalījumā (11).

DATU NOVĒRTĒŠANA

80. Ja jāizmanto šķīdinātāji/izkliedētājvielas, statistiskajai analīzei datus par šķīdinātāja kontrolēm un neapstrādātajām kontrolēm var apvienot ar nosacījumu, ka šķīdinātāja atbildreakcija un neapstrādātās kontroles atbildreakcija statistiski nozīmīgi neatšķiras.

Atkarīgie mainīgie

81. Testa mērķis ir noteikt testējamās ķimikālijas ietekmi uz testa augu veģetatīvo augšanu, izmantojot divus atkarīgos mainīgos: vidējo īpatnējo augšanas rādītāju un pieaugumu.

Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs

82. Šis atkarīgais mainīgais ir balstīts uz visā laika gaitā novērotām kopējā dzinumu garuma, kopējā dzinumu svaigsvara un kopējā dzinumu saussvara logaritmu pārmaiņām kontrolē un katrā apstrādes grupā. Šo mainīgo aprēķina katram katras kontroles un apstrādes grupas replikātam. Trim augiem uz katru testēšanas trauku (replikāts) vidējo garumu un svaru un pēc tam augšanas rādītāju katram replikātam aprēķina, izmantojot šādu formulu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kur:

μ_{i-j}: vidējais īpatnējais augšanas rādītājs no laikpunkta i līdz j

N_i: mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikpunktā i

N_j: mērījuma mainīgais testa vai kontroles traukā laikpunktā j

t: laiks no i līdz j

83. No replikātu atbildreakcijām jāaprēķina augšanas rādītāja vidējā vērtība kopā ar dispersijas aplēsēm attiecībā uz katru apstrādes un kontroles grupu.

84. Vidējais īpatnējais augšanas rādītājs jāaprēķina visam testa periodam (laikpunkts "i" iepriekš minētajā formulā ir testa sākums un laikpunkts "j" ir testa beigas). Katrai testējamajai koncentrācijai un kontrolei aprēķina vidējā īpatnējā augšanas rādītāja vidējo vērtību, kā arī dispersiju.

▼M7

85. Augšanas rādītāja procentuālo inhibēšanos (I_r) katrai testējamajai koncentrācijai (apstrādes grupai) var aprēķināt saskaņā ar šādu formulu:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kur:

% Ir: vidējā īpatnējā augšanas rādītāja procentuālā inhibēšanās

μC: vidējā vērtība μ kontrolē

μT: vidējā vērtība μ apstrādes grupā

Pieaugums

86. Šis atkarīgais mainīgais ir balstīts uz visā laika gaitā novērotām kopējā dzinumu garuma, kopējā dzinumu svaigsvara un kopējā dzinumu saussvara pārmaiņām kontrolē un katrā apstrādes grupā. Vidējo procentuālo pieauguma inhibēšanos (% I_y) katrai apstrādes grupai var aprēķināt šādi:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

kur:

% I_y: pieauguma procentuālais samazinājums

b_C: beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa kontroles grupai

b_T: beigu biomasa mīnus sākotnējā biomasa apstrādes grupai

Koncentrācijas–atbildreakcijas līknes zīmēšana

87. Jāzīmē koncentrācijas–atbildreakcijas līknes, kas atspoguļo atkarīgā mainīgā vidējo procentuālo inhibēšanos (I_r vai I_y) un ko aprēķina, kā parādīts iepriekš, un grafiski attēlo testējamās ķimikālijas logaritmizētu koncentrāciju.

***EC*x aplēse**

88. EC_x aplēses (piemēram, EC_{50}) jābalsta gan uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju (E_r C_x), gan pieaugumu (E_y C_x), no kuriem katrs savukārt jābalsta uz dzinumu kopējo svaigsvaru, dzinumu kopējo saussvaru un dzinumu kopējo garumu.

89. Jāatzīmē, ka EC_x vērtības, kas aprēķinātas, izmantojot šos divus atkarīgos mainīgos, nav salīdzināmas, un šī starpība tiek atzīta, izmantojot testa rezultātus. Ja tiek ievēroti šīs testēšanas metodes testa nosacījumi, lielākajā daļā gadījumu (sakarā ar attiecīgo pieeju matemātisko pamatojumu) uz vidējo īpatnējo augšanas rādītāju (E_y C_x) balstītās EC_x vērtības būs lielākas par rezultātiem, kas balstīti uz pieaugumu (E_y C_x). Šo starpību nedrīkst interpretēt kā abu atkarīgo mainīgo jutības starpību, jo šīs vērtības vienkārši ir matemātiski atšķirīgas.

Statistiskās procedūras

90. Mērķis ir regresijas analīzē iegūt koncentrācijas–atbildreakcijas kvantitatīvu sakarību. Iespējams izmantot svērto lineāro regresiju pēc tam, kad veikta atbildreakcijas datu linearizējoša transformācija, piemēram, probita, logita vai Veibula vienībās (13), bet priekšroka tiek dota nelineārās regresijas procedūru metodēm, ar kurām labāk risināt neizbēgamās datu neatbilstības un novirzes no līdzsvarota sadalījuma. Tuvu pie nulles vai pilnīgas inhibēšanās šādas neatbilstības var pastiprināt arī transformācija, kas traucē analīzi

▼M7

(13). Jāatzīmē, ka standarta analīzes metodes, kurās izmantoti probita, logita vai Veibula transformācijas modeļi, ir paredzētas tam, lai apstrādātu binārus datus (piemēram, mirstība vai izdzīvotība), un augšanas rādītāja vai pieauguma datiem tās būtu jāpielāgo. Īpašas procedūras EC_x vērtību noteikšanai, kurā izmanto nepārtrauktus datus, sk. (14), (15), (16) (17).

91. Katram analizējamajam atkarīgajam mainīgajam, izmantojot koncentrācijas–atbildreakcijas sakarību, aplēš EC_x vērtību punktus. Katrai aplēsei nosaka 95 % ticamības robežu, un vai nu grafiski vai statistiski novērtē atbildreakcijas datu atbilstību regresijas modelim. Regresijas analīze jāveic, izmantojot atsevišķo replikātu atbildreakcijas, nevis apstrādes grupas vidējos rādītājus.

92. EC_{50} aplēses un ticamības robežu var iegūt arī, izmantojot lineāro interpolāciju ar paškorelācijas (*bootstrapping*) metodi (18), ja datiem nav piemēroti pieejamie regresijas modeļi/metodes.

93. *LOEC* un līdz ar to *NOEC* novērtēšanai ir jāsalīdzina apstrādes vidējie rādītāji, izmantojot dispersijas analīzes (*ANOVA*) metodes. Tad katras koncentrācijas vidējo lielumu salīdzina ar kontroles vidējo lielumu, izmantojot piemērotu testēšanas metodi (piemēram, Daneta vai Viljamsa testi) (19), (20), (21), (22). Ir nepieciešams izvērtēt, vai attiecībā uz dispersiju spēkā ir *ANOVA* pieņēmums par normālu sadalījumu (*ND*) un dispersijas viendabīgumu (*VH*). Šis novērtējums jāveic ar Šapiro-Vilksa testu (*ND*) vai Lēvena testu (*VH*). Neatbilstību pieņēmumam par *ND* un dispersijas viendabīgumu dažkārt var koriģēt ar datu logaritmisko transformāciju. Ja dispersijas neviendabīgums un/vai novirze no *ND* ir ļoti izteikts un to nevar koriģēt ar transformāciju, jāapsver, vai analīzi neveikt ar tādām metodēm kā Bonferoni-Velča t-tests, descendents Džonkhīra-Terpstra tests un Bonferoni-mediānas tests. Papildu norādījumus par *NOEC* noteikšanu var atrast (16).

ZIŅOŠANA

94. Testēšanas pārskatā norāda šādu informāciju:

Testējamā ķimikālija

Vienkomponenta viela:

— fiziskais izskats, šķīdība ūdenī un papildu attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piemēram, IUPAC vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte attiecīgajā gadījumā un, ja praktiski iespējams, u. c.

Vairākkomponentu viela, *UVCB* un maisījumi:

— tiek iespējami izsmeļoši raksturoti pēc to komponentu ķīmiskās identitātes (sk. iepriekš), kvantitatīvās sastopamības un attiecīgajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga

— zinātniskais nosaukums un avots.

Testa nosacījumi

— iejušanās fāzes ilgums un apstākļi;

— izmantotā testa procedūra (statiska, pusstatiska, pulsācijas);

▼M7

— testa sākuma datums un tā ilgums;

— testa barotne, t. i., sedimenti un šķidra barotne ar barības elementiem;

— eksperimentālā plāna apraksts: audzēšanas kamera/telpa vai laboratorija, testa trauki un pārsegi, šķīdumu tilpumi, testa augu garums un svars uz vienu testa trauku testa sākumā, sedimentu virsmas un ūdens virsmas attiecība, sedimentu un ūdens tilpuma attiecība;

— testējamās koncentrācijas (nominālās un izmērītās, kā vajadzīgs) un replikātu skaits uz koncentrāciju;

— Izejšķīdumu un testa šķīdumu sagatavošanas metodes, tostarp jebkāda šķīdinātāja vai izkliedētājvielas lietošana.

— temperatūra testa laikā;

— gaismas avots, izstarojums ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$);

— testa un kontroles barotņu pH vērtības, kā arī testa barotņu izskats testa sākumā un beigās;

— skābekļa koncentrācijas;

— analīzes metode ar attiecīgiem kvalitātes novērtēšanas datiem (validācijas pētījumi, analīžu standartnovirzes un ticamības robežas);

— metodes mērījumu mainīgo, piemēram, garuma, saussvara, svaigsvara, noteikšanai;

— jebkādas novirzes no šīs testēšanas metodes.

Rezultāti

— izejas dati: katram saskaņā ar 1. tabulā sniegto novērtēšanas grafiku veiktam novērojumam un izdarītai analīzei — dzinumu garums un augu dzinumu/podu svars un citi mērījumu mainīgie;

— katra mērījuma mainīgā vidējie rādītāji un standartnovirzes.

— augšanas līknes katrai koncentrācijai;

— divkāršots laiks/augšanas rādītājs kontrolē, pamatojoties uz dzinumu garumu un svaigsvaru, tostarp variāciju koeficientu attiecībā uz svaigsvara pieaugumu;

— katram apstrādes replikātam aprēķinātie atkarīgie mainīgie, ar replikātu vidējiem rādītājiem un variācijas koeficientu;

— Koncentrācijas/ietekmes sakarības grafisks attēlojums.

— aplēses par toksiskajiem beigupunktiem attiecībā uz atkarīgajiem mainīgajiem, piemēram, EC_{50}, un saistītie ticamības intervāli. Ja aprēķinātas, *LOEC* un/vai *NOEC* un statistikas metodes, kas izmantotas to noteikšanai;

— ja izmantota *ANOVA*, tad nosakāmais ietekmes apjoms (piemēram, vismazākās būtiskās atšķirības);

— jebkāda augšanas stimulēšana, kas konstatēta jebkurā apstrādē;

▼M7

— jebkādas fitotoksiskuma vizuālās pazīmes, kā arī testa šķīdumu novērojumi;

— rezultātu apspriešana, tostarp jebkāda ietekme uz testa rezultātiem, kas izriet no novirzēm no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

(1) Šā pielikuma C.26. nodaļa: Lemna sp. Growth Inhibition Test.

(2) Šā pielikuma C.3. nodaļa: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 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 Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Šā pielikuma C.50. nodaļa: Sediment-free Myriophyllum spicatum Toxicity Test.

(8) Šā pielikuma C.28. nodaļa: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water.

(9) Ratte, M., H. Ratte (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, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 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, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), Curr "ent 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, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 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. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 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, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

1. papildinājums

SMĀRTA UN BARKO BAROTNES SASTĀVS

Komponents	Reaģenta daudzums, kas pievienots ūdenim (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (gaisa līdzsvars)	7,9

(*) demineralizēts (t. i., destilēts un dejonizēts) ūdens

▼M7

2. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Biomasa ir populācijas dzīvās matērijas svaigsvars un/vai saussvars. Šajā testā biomasa ir pamatdzinumu, visu sānu zaru un visu sakņu summa.

Ķimikālija ir viela vai maisījums.

Hloroze ir testa organisma, jo īpaši mieturu, krāsas maiņa no zaļas uz dzeltējošu.

***EC* x** ir testa barotnē izšķīdinātās testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas attiecīgajā ekspozīcijas periodā (īpaši jānorāda, ja ir novirzes no pilna vai normāla testa ilguma) rada *Myriophyllum spicatum* augšanas samazinājumu x % (piemēram, 50 %). Lai nepārprotami apzīmētu no augšanas rādītāja vai pieauguma izrietošo vērtību *EC*, augšanas rādītājam izmanto simbolu "E_r *C*" un pieaugumam — "E_y *C*", kam seko izmantotais mērījumu mainīgais, piemēram, "E_rC" (pamatdzinumu garums).

Augšana ir mērījumu mainīgā, piemēram, pamatdzinumu garuma, kopējā sānu zaru garuma, kopējā dzinumu garuma, kopējā sakņu garuma, svaigsvara, saussvara vai mieturu skaita palielināšanās visā testa periodā.

Augšanas rādītājs (vidējais īpatnējais augšanas rādītājs) ir mērījumu mainīgā logaritmisks pieaugums ekspozīcijas laikā. *Piezīme.* Ar augšanas rādītāju saistītie atkarīgie mainīgie nav atkarīgi no testa ilguma, ja vien neeksponētas kontroles organismu augšanas modelis ir eksponenciāls.

Zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ir zemākā testējamās ķimikālijas koncentrācija, kurai noteiktā ekspozīcijas laikā salīdzinājumā ar kontroli novērota statistiski būtiska ietekme ($p < 0,05$). Tomēr pie visām testējamajām koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta.

Mērījumu mainīgie ir jebkāda veida mainīgie, kas tiek mērīti, lai izteiktu testa beigupunktu, izmantojot vienu vai vairākus atkarīgos mainīgos. Šajā testēšanas metodē mērījumu mainīgie ir pamatdzinumu garums, kopējais sānu zaru garums, kopējais dzinumu garums, kopējais sakņu garums, svaigsvars, saussvars un mieturu skaits.

Monokultūra ir kultūra ar vienu augu sugu.

Nekroze ir nedzīvi (proti, balti vai tumšbrūni) testa organisma audi.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*) ir testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas ir tūlīt zem *LOEC*.

Atkarīgais mainīgais ir toksiskuma rādītājs, ko ar dažādu aprēķina metožu palīdzību iegūst no jebkura mērītā rādītāja, kas apraksta biomasu. Šīs testēšanas metodes atkarīgie mainīgie ir augšanas rādītājs un pieaugums, kas iegūti no tādiem mērījumu mainīgajiem kā pamatdzinumu garums, dzinumu kopējais garums, svaigsvars, saussvars vai mieturu skaits.

Pusstatisks (atjaunošanas) tests ir tests, kurā testa šķīdumu noteiktos intervālos testa laikā periodiski maina.

Statiskais tests ir testēšanas metode bez testa šķīduma atjaunošanas testa laikā.

▼M7

Testējamā ķimikālija ir jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Testa beigupunkts apraksta vispārīgo faktoru, kura mainīšana attiecībā pret testējamās ķimikālijas kontroli ir testa mērķis. Šajā testēšanas metodē testa beigupunkts ir augšanas inhibēšanās, ko var izteikt ar dažādiem atkarīgajiem rādītājiem, kuri balstās uz vienu vai vairākiem mērījumu mainīgajiem.

Testa barotne ir pilna sintētiskā augšanas barotne, uz kuras aug testa augi laikā, kad tos eksponē testējamai ķimikālijai. Testējamo ķimikāliju parasti izšķīdina testa barotnē.

UVCB ir viela ar nezināmu vai mainīgu sastāvu, komplekss reakcijas produkts vai bioloģisks materiāls.

Pieaugums ir mērījumu mainīgā vērtība, kas izsaka starpību starp biomasu ekspozīcijas perioda beigās un mērījumu mainīgo vērtību ekspozīcijas perioda sākumā. Piezīme. Ja neeksponētu organismu augšanas modelis ir eksponenciāls, uz pieaugumu balstīti atkarīgie mainīgie līdz ar testa ilgumu samazināsies.

▼M8

C.52. PAPLAŠINĀTAIS VIENAS MEDAKU PAAUDZES REPRODUKCIJAS TESTS (*MEOGRT*)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai (*TG*) Nr. 240 (2015). Paplašinātais vienas medaku paaudzes reprodukcijas tests (*MEOGRT*) ir visaptveroša testēšanas metode, kurā, izmantojot vairākās paaudzēs eksponētas zivis, iegūst datus, kas relevanti ķimikāliju (arī domājamu endokrīni disruptīvu ķimikāliju, EDĶ) ekoloģiskās bīstamības un radīto risku novērtēšanai. Testā *MEOGRT* ekspozīciju turpina līdz izšķilšanās brīdim (līdz divām nedēļām pēc apaugļošanas, npa) otrajā (F2) paaudzē. Lai pamatotu lietderību paaudzi F2 turpināt pēc izšķilšanās, būtu vajadzīga papildu izpēte; pašlaik nav pietiekamas informācijas, kas ļautu noteikt relevantus nosacījumus vai kritērijus, kuri dotu pamatu paaudzes F2 turpināšanai. Tomēr, ņemot vērā jaunu informāciju un datus, šī testēšanas metode var tikt atjaunināta. Noteiktos apstākļos (piem., ja ķimikālijai ir liels biokoncentrēšanās potenciāls vai indikācijas par pārpaaudzisku ietekmi citos taksonos), potenciāli varētu noderēt norādījumi par paaudzes F2 turpināšanu. Ar šo testēšanas metodi var izvērtēt ķimikāliju (arī potenciālu endokrīni disruptīvu ķimikāliju) potenciālo hronisko ietekmi uz zivīm. Metodē galvenais uzsvars likts uz potenciālo ietekmi populācijas līmenī (proti, nelabvēlīga ietekme uz izdzīvotību, attīstību, pieaugumu un reprodukciju), kas dod iespēju aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) vai efektīvo koncentrāciju (ECx); tomēr jāatzīmē, ka ECx pieejas reti ir piemērotas lieliem šāda veida pētījumiem, jo testējamo koncentrāciju skaitu palielināt tik lielā mērā, lai varētu noteikt vajadzīgo ECx, var būt nepraktiski, turklāt lielā izmantoto dzīvnieku skaita dēļ tas var radīt ievērojamas bažas no dzīvnieku labklājības viedokļa. Ja ķimikālija nav jānovērtē vairākās paaudzēs vai nav potenciāla endokrīni disruptīva ķimikālija, piemērotākas var būt citas testēšanas metodes (1). Piemērotākā suga šai testēšanas metodei ir Japānas medaka, jo tai ir īss dzīves cikls un var noteikt ģenētisko dzimumu (2), kas šajā metodē ir izšķirīgi svarīgi. Šajā metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku. Citas mazu sugu zivis (piem., zebrzivis) var izmantot ar līdzīgu testēšanas protokolu.

2. Šī testēšanas metode mēra vairākus bioloģiskos beigupunktus. Galvenais uzsvars likts uz potenciālo nelabvēlīgo ietekmi uz populācijas līmeņa parametriem, tostarp izdzīvotību, vispārējo attīstību, pieaugumu un reprodukciju. Otrkārt, lai iegūtu informāciju par mehānismiem un gūtu sasaisti ar citu veidu lauka un laboratorijas pētījumu rezultātiem gadījumos, kad ir vēlāki pierādījumi par ķimikālijas potenciālu būt endokrīni disruptīvai (piem., androgēniska vai estrogēniska darbība citos testos), noderīgu papildu informāciju iegūst, mērot vitelogenīna (vtg) informatīvo RNS (iRNS) (vai vitelogenīna proteīnu, VTG), fenotipiskās sekundārās dzimumpazīmes (SDzP), kas saistītas ar ģenētisko dzimumu, un izvērtējot histopatoloģiju. Jāpiezīmē: ja nav aizdomu, ka testējamā ķimikālija vai tās metabolīti varētu būt EDĶ, mērīt šos sekundāros beigupunktus var nebūt vajadzīgs un piemērotāk varētu būt veikt pētījumu, kurš prasa mazāk resursu un kurā izmanto mazāk dzīvnieku (1). Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

▼M8

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķimikālijas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, testēšanas metode tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. Datus var izmantot ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 5. līmenī (3). Testēšanas metodes sākumā pieaugušas zivis (paaudze F0) reproduktīvajā fāzē tiek eksponētas testējamajai ķimikālijai. Ekspozīcija turpinās paaudzes F1 attīstības un reprodukcijas, kā arī paaudzes F2 izšķilšanās laikā; tādējādi ar testu var izvērtēt gan strukturālos, gan aktivacionālos endokrīnos ceļus. Interpretējot endokrīnos beigupunktus, var izvēlēties pierādījumu svara pieeju.

4. Testā jāizmanto tik daudzi īpatņi, lai testa jauda būtu pietiekama reproduktīvi relevanto beigupunktu izvērtēšanai (sk. 3. papildinājumu), tomēr dzīvnieku labklājības nolūkā vienlaikus jārūpējas, lai tiktu izmantots minimālais vajadzīgais dzīvnieku skaits. Ņemot vērā, cik daudzi testa dzīvnieki vajadzīgi, ir rūpīgi jāapdomā, vai tests patiešām ir vajadzīgs, proti, vai relevantu informāciju par daudziem *MEOGRT* beigupunktiem jau nesatur esošie dati. Šajā ziņā var palīdzēt ESAO zivju toksicitātes testēšanas satvars (1).

5. Testēšanas metodes pamatmērķis ir noskaidrot vienas vielas ietekmi. Ja rodas vajadzība testēt maisījumu, ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus.

6. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķimikālijas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķimikālijas koncentrāciju verificēšanai.

TESTA PRINCIPS

7. Testa sākumā dzimumgatavus tēviņus un mātītes (vismaz 12 npa) vaislas pāros 3 nedēļas eksponē testējamajai ķimikālijai, kura šajā laikā atbilstoši savai toksikokinētiskajai uzvedībai izplatās vecākpaaudzes (F0) zivju organismā. Pēc iespējas tuvāk ceturtās nedēļas pirmajai dienai savāc ikrus paaudzes F1 sākšanai. Paaudzes F1 audzēšanas laikā (15 nedēļas) novērtē šķilstību [izšķilšanās rādītājs] un izdzīvotību. Turklāt izlases veidā 9–10 npa pārbauda zivju ontoģenētiskos beigupunktus un 12.–14. npa trīs nedēļas novērtē nārstošanu. Kad apritējusi trešā reproduktīvās novērtēšanas nedēļa, sāk paaudzi F2, ko audzē līdz izšķilšanās beigām.

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

8. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

— vidējai ūdens temperatūrai visā testa laikā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Atsevišķu akvāriju īslaicīgas novirzes no šīs vidējās vērtības nedrīkst pārsniegt 2 °C;

▼M8

— kontroļu vidējai fekunditātei abās paaudzēs (F0 un F1) jābūt lielākai nekā 20 ikri uz pāri dienā. Visu novērtēšanas laikā producēto ikru fertilitātei jāpārsniedz 80 %. Turklāt 16 no rekomendētajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu producēt vairāk nekā 20 ikrus uz pāri dienā;

— kontrolēs ikru šķilstībai jābūt ≥ 80 % (vidēji) (gan paaudzē F1, gan F2);

— izdzīvotībai pēc izšķilšanās līdz 3. npa un no 3. npa līdz paaudzes F1 nonāvēšanai (t. i., 15. npa) kontrolēs (F1) jābūt attiecīgi ≥ 80 % (vidēji) un ≥ 90 % (vidēji);

— jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

Lai gan ūdens temperatūra nav derīguma kritērijs, vienas apstrādes replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi un arī apstrādes grupas testā nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

9. Lai gan vairāk eksponētajās grupās var būt novērojami samazināti vairošanās rādītāji, reprodukcijai vismaz trešās lielākās ekspozīcijas grupā un visās mazākas ekspozīcijas F0 grupās jābūt pietiekamai, lai piepildītu šķilšanās inkubatorus. Turklāt paaudzes F1 trešās lielākās ekspozīcijas grupā un mazākas ekspozīcijas grupās embriju izdzīvotībai jābūt pietiekamai, lai būtu iespējams izvērtēt beigupunktus gandrīz pieaugušu īpatņu paraugojumā (sk. 36. un 38. punktu un 9. papildinājumu). Turklāt paaudzes F1 otrās augstākās ekspozīcijas grupā jābūt vismaz minimālai izdzīvotībai pēc izšķilšanās (~20 %). Tie nav gluži derīguma kritēriji, bet rekomendācijas, kuru ievērošana ļaus aprēķināt robustas *NOEC* vērtības.

10. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METODES APRAKSTS

Aprīkojums

11. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a) skābekļa un pH mērinstrumenti;

b) aprīkojums ūdens cietības un sārmainības noteikšanai;

c) attiecīgs aprīkojums temperatūras regulēšanai un, vēlams, nepārtrauktam monitoringam;

d) ķīmiski inerta materiāla tvertnes ar piemērotu ietilpību attiecībā uz ieteicamo noslogojumu un piepildītību (sk. 3. papildinājumu);

e) pietiekami precīzi svari (t. i., ar precizitāti ± 0,5 mg).

▼M8

Ūdens

12. Par testa ūdeni var izmantot jebkādu ūdeni, kurā testa sugu dzīvnieki uzrāda pietiekamu ilgtermiņa izdzīvotību un pieaugumu. Tā kvalitātei testa laikā jābūt nemainīgai. Lai nodrošinātu, ka atšķaidīšanai izmantotais ūdens nerada nepienācīgu ietekmi uz testa rezultātu (piem., testējamās ķimikālijas kompleksēšanās ceļā) vai nelabvēlīgi neietekmē vaislas zivju rādītājus, noteiktos starplaikos jāņem paraugi analīzei. Ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, tad, piem., reizi sešos mēnešos jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā.

Ekspozīcijas sistēma

13. Tas, kādai jābūt ekspozīcijas sistēmas uzbūvei un materiāliem, nav noteikts. Veidojot testa sistēmu, jāizmanto stikls, nerūsošais tērauds vai cits ķīmiski inerts materiāls, kas nav kontaminēts citos testos. Šā testa vajadzībām labi piemērota ekspozīcijas sistēma var būt pastāvīgas caurplūdes sistēma (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testa šķīdumi

14. Testējamās ķimikālijas izejšķīdumu ekspozīcijas sistēmā ievada ar piemērotu sūkni. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Atkarībā no testējamās ķimikālijas stabilitātes un ūdens kvalitātes testa šķīdumu katrā kamerā pienācīgi atjaunina (piem., no vismaz 5 tilpumatjaunināšanām dienā līdz 16 tilpumatjaunināšanām dienā vai līdz 20 ml/min caurplūdumam).

15. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams sagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (14). Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķimikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas, un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķimikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu Nr. 23 par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (15). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķimikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja par nesēju izmanto šķīdinātāju, jāizvērtē iespēja līdzās bezšķīdinātāja (negatīvajām) kontrolēm (tikai atšķaidīšanas ūdens) izmantot pienācīgas šķīdinātāja kontroles. Ja no šķīdinātāja

▼M8

izmantošanas nevar izvairīties un ir novērojama mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatā norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (15), un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas mazu (piem., < 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērītajiem beigupunktiem (16).

Testa dzīvnieki

Zivju izvēle un turēšana

16. Testa suga ir Japānas medaka (*Oryzias latipes*), jo tai ir īss dzīves cikls un nosakāms ģenētiskais dzimums. Lai gan ar līdzīgu testēšanas protokolu var izmantot citu mazu zivju sugu pārstāvjus, šajā testēšanas metodē aprakstītās konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti attiecas tikai uz Japānas medaku (sk. 1. punktu). Ir viegli panākt medakas vairošanos nebrīvē; ir publicētas tās kultivēšanas metodes (17) (18) (19), un ir pieejami dati no īstermiņa letalitātes, agrīno dzīves cikla stadiju un pilna dzīves cikla testiem (5) (6) (8) (9) (20). Visas zivis pakļauj 16 stundu fotoperiodam (16 gaismas stundas un 8 tumsas stundas). Zivis baro ar dzīviem sāļūdens vēžveidīgo *Artemia* spp. nauplijiem, vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārliecinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu.

17. Ja vien tiek ievērota pienācīga audzēšanas prakse, īpašs kultivēšanas protokols nav vajadzīgs. Piemēram, līdz 4. npa medakas var audzēt 2 l tvertnēs, kurās tur 240 zivju kāpurus uz tvertni, pēc tam līdz 8. npa 2 l tvertnēs, kurās tur 10 zivis uz tvertni, un beigās tās 2 l tvertnēs tur vaislas pāros.

Zivju aklimatizācija un atlase

18. Testa zivis jāatlasa no viena laboratorijas krājuma, kas vismaz divas nedēļas pirms testa aklimatizējies tādos ūdens kvalitātes un apgaismojuma apstākļos, kas līdzinās testa apstākļiem (piezīme: šis aklimatizācijas periods nav *in situ* pirmsekspozīcijas periods). Ir ieteicams testa zivis iegūt no iekšēja krājuma, jo pieaugušu zivju transportēšana ir stresors, kas var kavēt paredzamu nārstošanu. Zivis visa turēšanas perioda laikā divreiz dienā baro ar sāļūdens garneļu nauplijiem, un ekspozīcijas fāzē tām vajadzības gadījumā papildus dod komerciāli pieejamas barības pārslas. Uzskatāms, ka, lai nodrošinātu pietiekamu replikāciju, testa sākšanai vajadzīgi vismaz 42 vaislas pāri (ja vajadzīga šķīdinātāja kontrole, tad 54 vaislas pāri, daļēji tāpēc, ka nav vēsturisku datu, kas ļautu izmantot tikai bezšķīdinātāja kontroli). Turklāt, lai novērstu spontānu XX tēviņu iespējamu iekļaušanu, jāpārliecinās, ka katrs paaudzes F0 vaislas pāris ir XX un XY (proti, normāla dzimumhromosomu kombinācija gan mātītei, gan tēviņam) (sk. 39. punktu).

▼M8

19. Aklimatizācijas fāzē jāreģistrē kultivēto zivju mirstība un pēc 48 h stabilizācijas perioda jāpiemēro šādi kritēriji:

— ja mirstība kultivētajā populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu pārsniedz 10 %: partiju neizmanto vispār;

— ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu ir diapazonā no 5 % līdz 10 %: 2 nedēļu aklimatizācijas periodam pievieno vēl septiņas papildu dienas; ja nākamo septiņu dienu laikā mirstība pārsniedz 5 %, partiju neizmanto vispār;

— ja mirstība populācijā septiņās dienās pirms pārneses uz testa sistēmu ir zem 5 %: partiju pieņem.

20. Divu nedēļu aklimatizācijas periodā pirms testa zivīm nevajadzētu ārstēt slimības, un ekspozīcijas laikā no slimību ārstēšanas jāizvairās vispār, ja iespējams. Zivis ar klīniskām slimības pazīmēm pētījumā neizmanto. Jāfiksē visi novērojumi un profilaktiska vai terapeitiska slimību ārstēšana kultivēšanas periodā pirms testa.

21. Ekspozīcijas fāzi sāk ar ģenētiski dzimumdimorfām pieaugušām zivīm, kurām ir noteikts ģenētiskais dzimums un kuras izraudzītas no reproduktīvi nobriedušiem laboratorijas dzīvniekiem, kas kultivēti 25 ± 2 °C. Ņem zivis, kas nedēļā pirms ekspozīcijas pierādījušas spēju vairoties (proti, radījušas dzīvotspējīgus pēcnācējus). Visā testā izmantoto zivju grupā katra dzimuma īpatņu masai testa sākumā jābūt diapazonā ± 20 % no attiecīgā dzimuma īpatņu vidējās aritmētiskās masas. Lai aplēstu vidējo masu, apakšparaugotas zivis pirms testa nosver. Atlasītajām zivīm jābūt vismaz 12. npa, mātītēm ≥ 300 mg un tēviņiem ≥ 250 mg.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

22. Ieteicams izmantot piecas ķimikālijas koncentrācijas un vienu vai vairākas kontroles. Izvēloties testējamo koncentrāciju diapazonu, jāņem vērā visi informācijas avoti, tostarp struktūras un aktivitātes kvantitatīvās sakarības (*QSAR*), informācija par analogiem, zivju testu (piem., akūtās toksicitātes testu) rezultāti (šā pielikuma C.1. nodaļa), zivju īstermiņa reprodukcijas testu rezultāti (šā pielikuma C.48. nodaļa) un citu testēšanas metožu, piem., šā pielikuma C.15., C.37., C.41., C.47. vai C.49. nodaļā aprakstīto metožu (21) (22) (23) (24) (25) (26), rezultāti, ja tādi pieejami, vai, ja nepieciešams, rezultāti no diapazona noteikšanas testa, kurā var būt iekļauta arī reprodukcijas fāze. Ja nepieciešams, diapazona noteikšanas testu var veikt līdzīgos apstākļos (ūdens kvalitāte, testa sistēma, noslogojums ar dzīvniekiem) kā galīgo testu. Ja nākas izmantot šķīdinātāju un vēsturisku datu

▼M8

nav, diapazona noteikšanas testā var noskaidrot šķīdinātāja piemērotību. Augstākā testējamā koncentrācija nedrīkst pārsniegt šķīdību ūdenī, 10 mg/l vai 1/10 no 96 h LC_{50} (27). Zemākajai koncentrācijai jābūt 10 līdz 100 reizes mazākai par augstāko. Piecu koncentrāciju izmantošana šajā testā dod iespēju ne vien izmērīt devas–atbildreakcijas sakarības, bet arī noskaidrot zemāko nenovērojamās ietekmes koncentrāciju (*LOEC*) un *NOEC*, kas dažās regulatīvajās programmās vai jurisdikcijās ir nepieciešams riska novērtēšanai. Atstatuma koeficients starp testējamās ķimikālijas nominālajām koncentrācijām blakusesošos apstrādes līmeņos parasti ir ≤ 3,2.

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

23. Jāizmanto vismaz sešas replikātkameras uz testa koncentrāciju (sk. 7. papildinājumu). Reproduktīvajā fāzē (izņemot paaudzei F0) replikācijas struktūru dubulto fekunditātes novērtēšanai, un katrā replikātā ir tikai viens vaislas pāris (sk. 42. punktu).

24. Papildus testējamajām koncentrācijām vajadzīga arī atšķaidīšanas ūdens kontrole un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontrole. Lai nodrošinātu pietiekamu statistisko jaudu, kontrolēm jāizmanto dubults replikātkameru skaits (t. i., kontrolēm izmanto vismaz divpadsmit replikātus). Reproduktīvajā fāzē replikātu skaitu kontrolēs dubulto (t. i., vismaz 24 replikāti, tikai viens vaislas pāris uz replikātu). Pēc reproducēšanās kontroles replikātos vajadzētu būt ne vairāk kā 20 zivju embriju.

PROCEDŪRA

Testa sākšana

25. Reproduktīvi aktīvās pieaugušās zivis, ko izmanto testa paaudzes F0 izveidei, atlasa pēc diviem kritērijiem: vecums (parasti vairāk nekā 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa) un masa (≥ 300 mg mātītēm un ≥ 250 mg tēviņiem).

26. Mātīšu un tēviņu pārus, kas atbilst šīm specifikācijām, kā atsevišķus pārus ievieto katrā replikāttvertnē, tā testa sākumā iegūstot divpadsmit replikātus kontrolēs un sešus replikātus apstrādēs ar ķimikāliju. Šīm tvertnēm pēc nejaušības principa nosaka apstrādi (piem., T1–T5 un kontrole) un replikātu (piem., A–L kontrolei un A–F apstrādei) un tad ievieto ekspozīcijas sistēmā, uz katru tvertni nodrošinot attiecīgu plūsmu.

Ekspozīcijas nosacījumi

27. Pilnīgs testa parametru un nosacījumu kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ja šīs specifikācijas tiek ievērotas, kontroles zivju beigupunktu vērtībām vajadzētu būt līdzīgām tām, kas norādītas 4. papildinājumā.

28. Testa laikā vismaz vienā katras apstrādes grupas un kontroles testa traukā mēra izšķīdušo skābekli, pH un temperatūru. Šos mērījumus (izņemot temperatūras mērījumu) visā ekspozīcijas periodā veic vismaz reizi nedēļā. Vidējai ūdens temperatūrai visā testa laikā jābūt diapazonā no 24 līdz 26 °C. Temperatūru visā ekspozīcijas periodā mēra katru dienu. Ūdens pH jābūt diapazonā no 6,5 līdz 8,5, bet konkrētā testā tam jābūt ± 0,5 pH vienību diapazonā. Apstrādātie replikāti nedrīkstētu būt statistiski atšķirīgi, un arī apstrādātās testa grupas nedrīkstētu statistiski viena no otras atšķirties (ik dienas veiktu temperatūras mērījumu ziņā un neskaitot īslaicīgas novirzes).

▼M8

Ekspozīcijas ilgums

29. Testā trīs nedēļas tiek eksponētas reproduktīvi nobriedušas paaudzes F0 zivis. 4. nedēļā aptuveni 24. testa dienā izveido paaudzi F1, bet paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu (sk. 34. punktu). Pēc tam paaudzi F1 eksponē vēl 14 nedēļas (kopā 15 ekspozīcijas nedēļas paaudzei F1) un paaudzi F2 eksponē divas nedēļas līdz izšķilšanās laikam. Testa kopējais ilgums principā ir 19 nedēļas (t. i., līdz paaudzes F2 izšķilšanās laikam). Testa laika grafiki ir redzami 2. tabulā un vēl sīkāk izskaidroti 9. papildinājumā.

Barošanas režīms

30. Zivis var *ad libitum* barot ar sāļūdens vēžveidīgajiem *Artemia* spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas. Ar analīzēm regulāri pārliecinās, ka komerciāli pieejamajās barības pārslās nav kontaminantu, piemēram, hlororganisko pesticīdu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu (turpmāk "PAO") un polihlorbifenilu (turpmāk "PHB"). Jāizvairās no barības ar paaugstinātu endokrīni aktīvu vielu līmeni (piem., fitoestrogēniem), kas testā varētu ietekmēt atbildreakciju. No testēšanas traukiem pēc vajadzības jāizņem neapēstā barība un izkārnījumi, piem., katras tvertnes apakšdaļu rūpīgi iztīrot ar sifonu. Vienu vai divas reizes nedēļā jānotīra arī katras tvertnes sienas un dibens (piem., noskrāpējot netīrumus ar skrāpi). Barošanas režīma piemērs atrodams 5. papildinājumā. Barības daudzumu nosaka pēc zivju skaita uz replikātu. Tas nozīmē, ka barības daudzumu samazina, ja replikātā ir zivju nāves gadījumi.

Analītiskie konstatējumi un mērījumi

31. Pirms ekspozīcijas perioda sākuma jānodrošina pareiza ķimikālijas pievades sistēmas darbība. Visām nepieciešamajām analītiskajām metodēm jābūt atzītām, un nepieciešamas arī pietiekamas zināšanas par ķimikālijas stabilitāti testa sistēmā. Testa laikā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķimikālijas koncentrācijas, vēlams — vienā katras apstrādes grupas replikātā vismaz reizi nedēļā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu.

32. Testa laikā ar regulāriem starplaikiem (piem., vismaz trīs reizes nedēļā) pārbauda atšķaidītāja un izejšķīduma caurplūdumu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Ja ķimikālijas zivīs ievērojami uzkrājas, testa koncentrācijas, zivīm augot, var mazināties. Tādos gadījumos ieteicams testējamā šķīduma atjaunināšanās rādītāju katrā kamerā pielāgot tā, lai testa koncentrācijas paliktu iespējami nemainīgas.

Novērojumi un mērītie beigupunkti

33. Mērītie beigupunkti ir fekunditāte (potenciālā auglība), fertilitāte (faktiskā auglība), izšķilšanās, pieaugums un izdzīvotība, kas ļauj izvērtēt iespējamās populācijas līmeņa ietekmes. Ik dienas turklāt jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Citi mehānistiski beigupunkti ietver hepatiskos vtg iRNS vai VTG proteīnu līmeņus, kas noteikti imūntestā (28), fenotipiskos dzimummarķierus, piem., raksturīgās tēviņu anālās spuras papillas, gonādiskā dzimuma histoloģisko izvērtējumu un nieru, aknu un gonādu histopatoloģisko izvērtējumu (sk. beigupunktu sarakstu 1. tabulā). Visus šos specifiskos beigupunktus izvērtē īpatņa ģenētiskā dzimuma noteikšanas kontekstā, balstoties uz medakas tēviņu gēna *dmy* klātesību vai neesību (sk. 41. punktu). Izvērtē arī laiku līdz nārstošanai. Turklāt, izmantojot anālās

▼M8

spuras papillu skaitu, var iegūt vienkāršu fenotipisko dzimumu attiecību, kas ļauj konkrētas medakas atzīt par fenotipiskiem tēviņiem vai mātītēm. Nav gaidāms, ka šī testēšanas metode ļaus noteikt pieticīgas novirzes no paredzamās dzimumu attiecības, jo salīdzinoši mazais zivju skaits replikātā nedod pietiekamu statistisko jaudu. Turklāt histopatoloģiskās novērtēšanas laikā tiek izvērtētas gonādas un tiek veiktas daudz spēcīgākas gonādiskā fenotipa analīzes ģenētiskā dzimuma kontekstā.

34. Galvenais šīs testēšanas metodes mērķis ir novērtēt testējamās ķimikālijas iespējamo populācijas līmeņa ietekmi. Mehānistiski beigupunkti (VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var palīdzēt arī noteikt, vai ietekmi mediē endokrīnā iedarbība. Tomēr šos mehānistiskos beigupunktus var iespaidot arī sistēmiska toksicitāte vai cita toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas.

Humāna zivju nonāvēšana

35. Beidzot paaudzes F0 un F1 ekspozīciju, kad tiek apakšparaugotas gandrīz pieaugušas zivis, zivis būtu jānonāvē ar pienācīgu anestētiska šķīduma daudzumu (piem., trikaīna metānsulfonātu, MS-222 (*CAS* Nr.: 886-86-2), 100–500 mg/l), ko gļotādu kairinājuma mazināšanai atšķaida ar 300 mg/l $NaHCO_3$ (nātrija bikarbonāts, *CAS* Nr.: 144-55-8). Ja zivīm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja zivi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī zivi eitanazē, var zivi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (zivi fiksēt iespējamas histopatoloģijas vajadzībām).

Manipulācijas ar ikriem un zivju kāpuriem

Ikru ievākšana no vaislas pāriem nākamās paaudzes iegūšanai

36. Pārejot no paaudzes F0 uz paaudzi F1, ikrus ievāc 4. testa nedēļas pirmajā dienā (vai vajadzības gadījumā pirmajās divās dienās), bet no paaudzes F1 uz paaudzi F2 — 18. nedēļas pirmajā dienā (vai attiecīgi pirmajās divās dienās). 18. testa nedēļa atbilst pieaugušām paaudzes F1 zivīm 15 npa (nedēļas pēc apaugļošanas). Lai nodrošinātu, ka visi no vaislas pāra ievāktie ikri ir no viena nārsta, ir svarīgi no katras tvertnes dienu pirms ikru ievākšanas iztīrīt visus iepriekšējos ikrus. Pēc nārsta medaku mātītes dažkārt ikrus līdz brīdim, kad tos var novietot uz substrāta, tur pie uroģenitālās atveres. Ja tvertnē substrāta nav, ikri būs vai nu pie mātītes, vai tvertnes dibenā. Atkarībā no to novietojuma ikrus 4. testa nedēļā (F0) vai 18. testa nedēļā (F1) vai nu uzmanīgi noņem no mātītes, vai ar sifonu noņem no tvertnes dibena. Visus vienā apstrādes reizē ievāktos ikrus pirms ievietošanas inkubācijas kamerās apvieno.

▼M8

37. Ikru pavedienus, kas iznērstos ikrus notur kopā, noņem. No katra vaislas pāra (1 pāris uz replikātu) ievāc apaugļotos ikrus (līdz 20), tos sagrupē pēc apstrādes un sistemātiski sadala pa piemērotām inkubācijas kamerām (6., 7. papildinājums). Izmantojot kvalitatīvu stereomikroskopu, var saskatīt agrīnas apaugļošanās/attīstības pazīmes, piem., apaugļošanās plēves (horija) piebriešanu, notiekošu šūnu dalīšanos vai blastulas veidošanos. Inkubācijas kameras var ievietot atsevišķos "inkubācijas akvārijos", ko izveido katrai apstrādei (kādā gadījumā tajos jāmēra ūdens kvalitātes parametri un testējamās ķimikālijas koncentrācijas), vai replikātakvārijā, kurā tur izšķīlušos kāpurus (piem., eleiteroembrijus jeb brīvi peldošos embrijus). Ja vajadzīga otrā vākšanas diena (23. testa diena), apkopo visus ikrus no abām dienām un tos sistemātiski iedala katrā apstrādes replikātā.

Ikru audzēšana līdz izšķilšanās brīdim

38. Apaugļotos ikrus pastāvīgi kustina, piem., inkubatorā laižot gaisa burbuļus vai inkubatoru vertikāli šūpojot. Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. Nedzīvos ikrus no inkubatoriem izņem (9. papildinājums). 7. dienā pēc apaugļošanas (dpa) kustināšanu izbeidz vai samazina tā, lai apaugļotie ikri nosēstos inkubatora dibenā. Tas veicina izšķilšanos, kas parasti notiek nākamajā vai aiznākamajā dienā. Saskaita katrā apstrādes un kontroles grupā izšķīlušos īpatņus (jaunos kāpurus, eleiteroembrijus) (replikātus apvienojot). Apaugļotus ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkāršotai medianālajai dienai (parasti 16. vai 18. dpa), uzskata par dzīvotnespējīgiem un atmet.

39. Katrā replikāttvertnē ievieto divpadsmit izšķīlušos īpatņus. Izšķīlušos īpatņus no inkubācijas kamerām sakopo un sistemātiski sadala pa replikāttvertnēm (7. papildinājums). To var izdarīt, pēc nejaušības principa izvēloties izšķīlušos īpatni no apstrādes grupas un tad izšķīlušos īpatni neselektīvi ievietojot replikātakvārijā. Katrā tvertnē jābūt vienādam skaitam (n=12) izšķīlušos kāpuru (ne vairāk kā 20 kāpuru katrā). Ja nav pietiekami daudz kāpuru, lai varētu aizpildīt visus apstrādes replikātus, ir ieteicams tos sadalīt tā, lai pēc iespējas lielākā skaitā replikātu būtu 12 kāpuri. Ar kāpuriem var droši veikt manipulācijas, izmantojot liela diametra stikla pipetes. Liekos kāpurus humāni nonāvē ar anestēzijas līdzekli. Pēdējās nedēļās pirms vaislas pāru izveides reģistrē dienu, kurā katrā replikātā konstatē pirmo nārstošanu.

Vaislas pāru sagatavošana

Spuru paraugošana un genotipiskā dzimuma noteikšana

40. Genotipiskā dzimuma noteikšanu spuru paraugošanas ceļā veic 9–10 npa (t. i., paaudzei F1 12.–13. testa nedēļā). Lai noteiktu īpatņa genotipisko dzimumu, visas tvertnē esošās zivis anestezē (izmantojot apstiprinātas metodes, piem., *IACUC*) un no astes spuras dorsālā vai ventrālā gala paņem nelielu audu paraugu (29). Replikāta zivis var turēt replikāttvertnē nelielos būros, vēlams, pa vienai zivij uz būri. Ja tās vienu no otras var atšķirt, katrā būrī var turēt arī divas zivis. Viena metode, kā to panākt, ir, ņemot audu paraugu, astes spuru apgriezt atšķirīgi (piem., vienai dorsālo, vienai ventrālo galu).

▼M8

41. Medakas genotipisko dzimumu nosaka ar identificētu un sekvenētu gēnu (*dmy*), kas atrodas Y hromosomā. *dmy* klātbūtne liecina par liecina par XY īpatni (neatkarīgi no fenotipa), savukārt *dmy* trūkums liecina par XX īpatni (neatkarīgi no fenotipa) (30); (31). No katra spuras apgriezuma ekstrahē dezoksiribonukleīnskābi (DNS), un *dmy* klātesību vai neesību var noteikt ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodēm (sk. šā pielikuma C.41. nodaļas 9. papildinājumu vai 3. un 4. papildinājumu avotā (29)).

Vaislas pāru izveide

42. Izmantojot informāciju par genotipisko dzimumu, izveido XX–XY vaislas pārus neatkarīgi no ārējā fenotipa, ko var ietekmēt ekspozīcija testējamajai ķimikālijai. Nākamajā dienā pēc tam, kad noteikts katras zivs genotipiskais dzimums, pēc nejaušības principa no katra replikāta izvēlas divas XX zivis un divas XY zivis un izveido divus XX–XY vaislas pārus. Ja replikātā vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, piemērotas zivis ņem no citiem apstrādes replikātiem. Galvenais ir iegūt ieteikto replikātu vaislas pāru skaitu (12) katrā apstrādes grupā un kontrolēs (24). Veidojot vaislas pārus, neņem zivis ar acīmredzamām anormālijām (problēmas ar peldpūsli, deformēts mugurkauls, ārkārtējas lieluma variācijas utt.). F1 reproduktīvajā fāzē katrā replikāttvertnē vajadzētu būt tikai vienam vaislas pārim.

Gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāros neiekļauto zivju paraugošana

43. Pēc vaislas pāru sagatavošanas zivis, ko tālākai pavairošanai neizraugās, humāni nonāvē, lai varētu veikt gandrīz pieaugušu īpatņu beigupunktu mērījumus 12.–13. testa nedēļā (F1). Ir ļoti svarīgi ar zivīm apieties tā, lai joprojām varētu izsekot, kāds genotipiskais dzimums konkrētai zivij noteikts vaislas pāru atlases laikā. Visi savāktie dati tiek analizēti konkrētās zivs genotipiskā dzimuma kontekstā. Katru zivi izmanto dažādiem beigupunktu mērījumiem, tostarp nosaka zivju mazuļu / gandrīz pieaugušu zivju izdzīvotību (7.–12./13. testa nedēļa (F1)), pieaugumu garumā (ja astes spura ir īsāka tāpēc, ka veikta paraugošana ģenētiskā dzimuma analīzei, var mērīt standartgarumu; kopējo garumu var mērīt tikai tad, ja *dmy* noteikšanas vajadzībām paraugota tikai astes spuras dorsālās vai ventrālās daivas gala daļa) un ķermeņa masu (t. i., slapjmasu pēc nosusināšanas), aknu vtg iRNS (vai VTG) un anālās spuras papillas (sk. 1. un 2. tabulu). Jāņem vērā, ka vaislas pāru masa un garums vajadzīgs arī apstrādes grupas vidējā pieauguma aprēķinam.

Audu paraugošana un vitelogenīna mērīšana

44. Aknas izpreparē un līdz vtg iRNS (vai VTG) mērīšanai glabā ≤ –70 °C. Zivs asti, arī anālo spuru, saglabā piemērotā fiksatorā (piem., Deividsona fiksatorā) vai nofotografē tā, lai vēlāk varētu izskaitīt anālās spuras papillas. Vajadzības gadījumā šajā laikā var paraugot un saglabāt arī citus audus (piem., gonādas). Aknu VTG koncentrāciju kvantificē ar homologu *ELISA* paņēmienu (sk. attiecībā uz medaku ieteiktās procedūras šā pielikuma C.48. nodaļas 6. papildinājumā). Alternatīvas metodes, kā kvantificēt vtg iRNS, t. i., ekstrahēt gēna *vtg I* iRNS no aknu parauga un noteikt gēna *vtg I* kopiju

▼M8

skaitu (uz kopējās iRNS ng) ar kvantitatīvu PĶR, izstrādājusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (29). Mazāk resursprasīga un tehniski vienkāršāka metode ir nevis noteikt gēna *vtg* kopiju skaitu kontroles un apstrādes grupās, bet gan noteikt relatīvo (kārtas) izmaiņu gēna *vtg I* ekspresijā kontroles un apstrādes grupās.

Sekundārās dzimumpazīmes

45. Parastos apstākļos tikai dzimumgatavību sasniegušiem medaku tēviņiem ir papillas, kas kā sekundāra dzimumpazīme attīstās uz dažu anālās spuras staru savienojumplātnītēm un ir potenciāls endokrīni disruptīvas ietekmes biomarķieris. Anālās spuras papillu (to savienojumplātnīšu, kam ir papillas) skaitīšanas metode ir sniegta 8. papildinājumā. Īpatņa anālās spuras papillu skaitu izmanto arī tam, lai attiecīgo īpatni kategorizētu par ārēji fenotipisku tēviņu vai mātīti nolūkā aprēķināt vienkāršu dzimumu attiecību replikātā. Medaku, kam papillu ir vairāk nekā 0, uzskata par tēviņu; medaku, kam anālās spuras papillu nav, uzskata par mātīti.

Fekunditātes un fertilitātes novērtēšana

46. Paaudzē F0 fekunditāti un fertilitāti novērtē 1. līdz 3. testa nedēļā, bet paaudzē F1 — 15. līdz 17. testa nedēļā. 21 dienu pēc kārtas no katra vaislas pāra ik dienas savāc ikrus. Ikrus katru rītu uzmanīgi noņem no ar tīklu notvertu mātīšu pavēderes un/vai ar sifonu noņem no akvārija dibena. Katru dienu reģistrē gan katra replikātu vaislas pāra fekunditāti, gan fertilitāti. Fekunditāte (potenciālā auglība) pēc definīcijas ir iznērsto ikru skaits, bet fertilitāte (faktiskā auglība) pēc funkcionālās definīcijas ir apaugļoto un dzīvotspējīgo ikru skaits skaitīšanas laikā. Skaitīšanu veic iespējami drīz pēc ikru ievākšanas.

47. Replikātu fekunditāti ik dienas reģistrē kā ikru skaitu uz vaislas pāri; to analizē ar ieteiktajām statistiskajām procedūrām, izmantojot replikātu vidējās vērtības. Replikātu fertilitāte ir vaislas pāra auglīgo ikru kopskaits, kas dalīts ar attiecīgā pāra ikru kopskaitu. Statistiski fertilitāti analizē kā attiecību vienā replikātā. Replikāta šķilstība ir izšķīlušos īpatņu skaits, dalīts ar ievietoto embriju skaitu (parasti 20). Statistiski šķilstību analizē kā attiecību vienā replikātā.

Pieaugušu īpatņu paraugošana un beigupunktu novērtēšana

Vaislas pāru ziviju paraugošana

48. Pēc 17. testa nedēļas (proti, kad veiksmīgi sākusies paaudze F2) pieaugušos paaudzes F1 īpatņus humāni nonāvē un novērtē dažādus beigupunktus (sk. 1. un 2. tabulu). Anālo spuru nofotografē, lai novērtētu spuras papillas sk. 8. papildinājumu), un/vai asti tieši aiz uroģenitālās atveres noņem un saglabā ar fiksatoru, lai papillas varētu izskaitīt vēlāk. Ja vēlas, daļu astes spuras šajā laikā var paraugot un arhivēt, lai varētu verificēt ģenētisko dzimumu (*dmy*). Vajadzības gadījumā var paņemt audu paraugu, lai varētu atkārtot *dmy* analīzi konkrētās zivs ģenētiskā dzimuma verificēšanai. Ķermeņa dobumu atver, lai to būtu iespējams caurskalot ar piemērotiem fiksatoriem (piem., Deividsona fiksatoru), un visu ķermeni iegremdē fiksatorā. Tomēr, ja pirms fiksācijas veic pienācīgu permeabilizāciju, ķermeņa dobumu atvērt nav vajadzības.

▼M8

Histopatoloģija

49. Katru zivi histoloģiski izmeklē uz patoloģijām gonādiskajos audos (30) (29). Kā minēts 33. punktā, citus šajā testā izvērtētos mehānistiskos beigupunktus (t. i., VTG, SDzP un konkrētas gonādiskas histopatoloģiskās ietekmes) var ietekmēt arī sistēmiska vai citāda toksicitāte. Līdz ar to, lai varētu vieglāk saprast atbildreakcijas mehānistiskajos beigupunktos, var būt vajadzība detalizēti novērtēt arī aknu un nieru histopatoloģiju. Ja šo detalizēto izmeklēšanu tomēr neveic, jebkurā gadījumā jāatzīmē un pārskatā jānorāda histopatoloģiskajā izvērtēšanā nejauši ievērotas būtiskas anormālijas. Var apsvērt "lejupēju lasīšanu" no augstākās apstrādes grupas (salīdzinājumā ar kontroli) uz apstrādes grupu, kurā ietekme nav novērojama, taču ir ieteicams iepazīties ar histopatoloģijai veltītajiem norādījumiem (29). Parasti visus paraugus sagatavo/sadala, bet pēc tam tos nolasa patologs. Ja izmanto "lejupējās lasīšanas" ieeju, jāpiezīmē, ka procedūras *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (*RSCABS*) pamatā ir pieņēmums, ka, palielinoties devas līmeņiem, palielināsies arī bioloģiskā ietekme (patoloģija). Tāpēc, ja novērtē tikai vienas lielas devas atstātu ietekmi, neskatot vidējas devas, mazinās testa jauda. Šāda pieeja var būt pieņemama, ja, lai noteiktu, ka lielajai devai ietekmes nav, statistiska analīze nav vajadzīga. Šajā izvērtējumā noskaidro arī gonādisko fenotipu.

Citi novērojumi

50. *MEOGRT* sniedz datus, ko var izmantot (piem., pierādījumu svara pieejā), lai vienlaicīgi izvērtētu vismaz divu galveno veidu nelabvēlīga iznākuma ceļus (*AOP*), kas noved pie reproduktīvajiem traucējumiem: a) endokrīniski mediēti ceļi, kas disruptē hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) endokrīnisko asi, un b) neendokrīniski mediētas toksicitātes ceļi, kas izraisa izdzīvotības, pieauguma (garums un masa) un reproduktīvo rādītāju samazinājumu. Šajā testā ir iekļauti arī beigupunkti, ko parasti mēra hroniskās toksicitātes testos, piemēram, pilna dzīves cikla testā un agrīno dzīves cikla stadiju testā, un ar tiem var izvērtēt briesmas, ko rada gan neendokrīniski mediēti toksiskās iedarbības veidi, gan endokrīniski mediēti toksicitātes ceļi. Testa laikā ik dienas jānovēro uzvedība un jāatzīmē jebkādas uzvedības īpatnības. Turklāt jāreģistrē jebkāda mirstība un jāaprēķina izdzīvotība līdz zivju atlasei (6./7. testa nedēļa), izdzīvotība pēc atlases līdz gandrīz pieaugušu īpatņu paraugošanai (9.–10. npa) un izdzīvotība no pāru izveides līdz pieaugušu zivju paraugošanai.

1. tabula

Pārskats par MEOGRT beigupunktiem (*)

Dzīves cikla stadija	Beigupunkts	Paaudze
Embriji (2 npa)	Šķilstība (% un laiks līdz izšķilšanās brīdim)	F1, F2
Mazuļi (4 npa)	Izdzīvotība	F1
Gandrīz pieauguši īpatņi (9 vai 10 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	

▼**M8**

Dzīves cikla stadija	Beigupunkts	Paaudze
	Vitelogenīns (iRNS vai proteīns)	
	Sekundārās dzimumpazīmes (anālās spuras papillas)	
	Dzimumu attiecība pēc ārējām pazīmēm	
	Laiks līdz 1. nārstam	
Pieaugušas zivis (12–14 npa)	Reprodukcija (fekunditāte un fertilitāte)	F0, F1
Pieaugušas zivis (15 npa)	Izdzīvotība	F1
	Pieaugums (garums un masa)	
	Sekundārās dzimumpazīmes (anālās spuras papillas)	
	Histopatoloģija (gonādu, aknu, nieru)	

(*) Šie beigupunkti jāanalizē statistiski.

NORISES GRAFIKS

51. 2. tabulā sniegtais *MEOGRT* norises grafiks atspoguļo testa gaitu. *MEOGRT* laikā 4 nedēļas tiek eksponēti pieauguši paaudzes F0 īpatņi un 15 nedēļas — paaudzes F1 īpatņi, kā arī otrā paaudze (F2), kas tiek eksponēta līdz izšķilšanās laikam (2 npa). Kopsavilkums par *MEOGRT* posmiem ir pieejams 9. papildinājumā.

2. tabula

MEOGRT ekspozīcijas un beigupunktu mērījumu grafiks

***MEOGRT* ekspozīcijas un beigupunktu grafiks**

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Dzīves cikla stadijas atslēga					**Embriji**					**Kāpuri**					**Mazuļi**			**Gandrīz pieauguši īpatņi**	**Pieaugušas zivis**
Beigupunkti																			
Fekunditāte	F_0														F_1				
Fertilitāte	F_0														F_1				
Šķilstība					F_1														F_2
Izdzīvotība						F_1						F_1						F_1	
Pieaugums				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenīns												F_1							
Sekundārās dzimumpazīmes												F_1						F_1	
Histopatoloģija																		F_1	
Testa nedēļa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Eksperimenta plāns: 7 replikātu grupas
  - 5 grupas apstrādā ar testējamo ķimikāliju
  - 2 grupas ir kontroles (ja izmanto šķīdinātāju, 4)
- Grupu uzbūve:
  - 12 replikāti reprodukcijas, pieaugušu zivju patoloģiju un SDzP noteikšanai (10. līdz 18. ned.)
  - 6 replikāti šķilstības, izdzīvotības, vtg un gandrīz pieaugušu īpatņu SDzP un pieauguma noteikšanai (1. līdz 9. ned.)

SDzP: sekundārās dzimumpazīmes; ned.: nedēļa;
vtg: vitelogenīns

▼M8

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

52. Tā kā visām testa zivīm nosaka genotipisko dzimumu, dati par katra genotipiskā dzimuma zivīm (t. i., XY tēviņiem un XX mātītēm) analizējami atsevišķi. Ja tā nerīkojas, ievērojami samazinās analīzes statistiskā jauda. Veicot datu statistisko analīzi, vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas ESAO dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* ["Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi"] (32). Sīkāki norādījumi par statistisko analīzi sniegti 10. papildinājumā.

53. Testa plānam un statistisko testu atlasei vajadzētu dot pietiekamu jaudu, lai varētu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* (32). Relevanto efektīvo koncentrāciju un parametru ziņošana var būt atkarīga no tiesiskā regulējuma. Ir jāidentificē katra tāda beigupunkta procentuālās izmaiņas, kuru ir svarīgi noteikt vai aplēst. Eksperimenta plāns jāizstrādā tā, lai tas būtu iespējams. Maz ticams, ka visiem beigupunktiem procentuālās izmaiņas būs vienādas, un tāpat ir maz ticams, ka var izplānot reālistisku eksperimentu, kurš šiem kritērijiem atbilstu attiecībā uz visiem beigupunktiem, tāpēc, lai eksperimentu izplānotu pienācīgi, galvenā uzmanība ir jāpievērš beigupunktiem, kas ir svarīgi konkrētajam eksperimentam. 10. papildinājumā ir pieejama statistiskās analīzes plūsmas diagramma un norādījumi, kā apstrādāt datus un izvēlēties vispiemērotāko statistisko testu vai modeli. Var izmantot arī citas statistiskas pieejas, ja tās ir zinātniski pamatotas.

54. Katras replikātu kopas ietvaros jāanalizē variācijas, izmantojot dispersijas analīzi vai kontingences tabulu, kā arī pietiekamas un piemērotas statistiskās analīzes metodes, kuru pamatā ir šī analīze. Lai varētu veikt multiplo salīdzinājumu starp atsevišķo koncentrāciju un kontroļu rezultātiem, nepārtrauktas atbildreakcijas gadījumā ieteicams izmantot descendentu procedūru (piemēram, Džonkhīra–Terpstras testu). Ja dati neatbilst monotonai atbildreakcijai uz koncentrāciju, būtu jāizmanto Daneta tests vai Dannas tests [*Dunn's test*] (pēc pienācīgas datu transformēšanas, ja tāda vajadzīga).

55. Nosakot fekunditāti, ikrus skaita ik dienas, bet tos var analizēt kā ikru kopskaitu vai kā atkārtotu mērījumu. Sīkāka informācija par to, kā analizēt šo beigupunktu, atrodama 10. papildinājumā. Histopatoloģijas datiem, kas ir smaguma atzīmju formā, ir izstrādāts jauns statistiskais tests — *Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices* (*RSCABS*) (33).

56. Pārskatā norāda visus ar ķimikāliju apstrādātajā grupā novērotos beigupunktus, kas ievērojami atšķiras no attiecīgo kontroļu beigupunktiem.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu apstrādes līmeņu izmantošana

57. Nosakot, vai replikāts vai visa apstrādes grupa liecina par acīmredzamu toksicitāti un būtu no analīzes jāizslēdz, jāņem vērā vairāki faktori. Acīmredzamu toksicitāti definē kā > 4 tādus nāves gadījumus vienā replikātā laikā no 3. līdz 9. npa, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Citas acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir hemorāģijas, anormāla uzvedība, anormāla peldēšana,

▼M8

anoreksija un jebkuras citas klīniskas saslimšanas pazīmes. Subletālām toksicitātes pazīmēm var būt nepieciešama kvalitatīva izvērtēšana, un tā vienmēr jāveic salīdzinājumā ar atšķaidīšanai izmantotā ūdens kontrolgrupu (tikai tīrs ūdens). Ja acīmredzama toksicitāte ir novērojama augstākā līmeņa vai līmeņu apstrādēs, šīs apstrādes no analīzes cenzē.

Šķīdinātāja kontroles

58. Šķīdinātāja izmantošana ir apsverama tikai kā galējs līdzeklis, kad visas citas ķimikālijas padošanas iespējas ir jau izskatītas. Ja lieto šķīdinātāju, kopā ar to izmanto arī atšķaidīšanas ūdens kontroli. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi. To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, tas, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi jāizvērtē speciālistam. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

Testēšanas pārskats

59. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija: fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības:

— ķīmiskās identifikācijas dati;

vienkomponenta viela:

— izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

— ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);

daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

— iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

— zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas.

Testa apstākļi:

— fotoperiodi

— testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, izšķīlušos īpatņu skaits uz replikātu);

▼M8

— izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjaunināšanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);

— testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);

— metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

— nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

— sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

— Pierādījumi, ka kontroles atbilst vispārīgajiem derīguma kritērijiem:

— šādi dati par kontrolgrupu (un arī šķīdinātāja kontroli, ja tādu izmanto) un apstrādes grupām: F1 un F2 izšķilšanās rādītāji (šķilstība un laiks līdz izšķilšanās brīdim), F1 izdzīvotība pēc izšķilšanās, F1 pieaugums (garums un ķermeņa masa), F1 genotipiskais dzimums un dzimumdiferenciācija (t. i., sekundārās dzimumpazīmes — anālās spuras papillas un gonādu histoloģija), F1 fenotipiskais dzimums, F1 sekundārās dizmumpazīmes (anālās spuras papillas), F1 vtg iRNS (vai VTG proteīns), F1 histopatoloģiskais novērtējums (gonādas, aknas un nieres) un F0 un F1 reprodukcija (fekunditāte un fertiliāte — potenciālā un faktiskā auglība) (sk. 1. un 2. tabulu);

— statistiskās analīzes pieeja (regresijas analīze vai dispersijas analīze) un datu apstrāde (izmantotie statistiskie testi un modeļi);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) (p=0,05); katrai novērtētajai atbildreakcijai — EC_x (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 90 % vai 95 %) un EC_x aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartkļūdas;

— jebkādas novirzes no šīs testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi attiecībā uz iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.

▼M8

60. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).

LITERATŪRA

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (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 and 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 and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and 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 and 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 and 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 and 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 and 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 and 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. Available at: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and 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.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (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 and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and 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) Šā pielikuma C.15. nodaļa. Īstermiņa toksicitātes tests zivīm embrija un dzeltenummaisa attīstības posmos.

(22) Šā pielikuma C.37. nodaļa. Zivju 21 dienas tests. Estrogēniskās un androgēniskās darbības un aromatāzes inhibēšanās īstermiņa skrīnings.

(23) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.

(24) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsais zivju vairošanās tests.

(25) Šā pielikuma C.47. nodaļa. Zivju agrīno attīstības stadiju toksicitātes tests.

(26) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (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 and 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). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and 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 and 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 (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

1. Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

Fekunditāte: ikru skaits.

Fertilitāte: dzīvotspējīgo ikru skaits / fekunditāte.

Garums līdz astes spuras sazarojuma vietai (GLS): garums no purna gala līdz vidējo astes spuras staru galam; to izmanto attiecībā uz zivīm, kurām grūti noteikt, kur beidzas mugurkauls (www.fishbase.org).

Šķilstība: izšķīlušos īpatņu skaits / inkubatorā ievietoto embriju skaits.

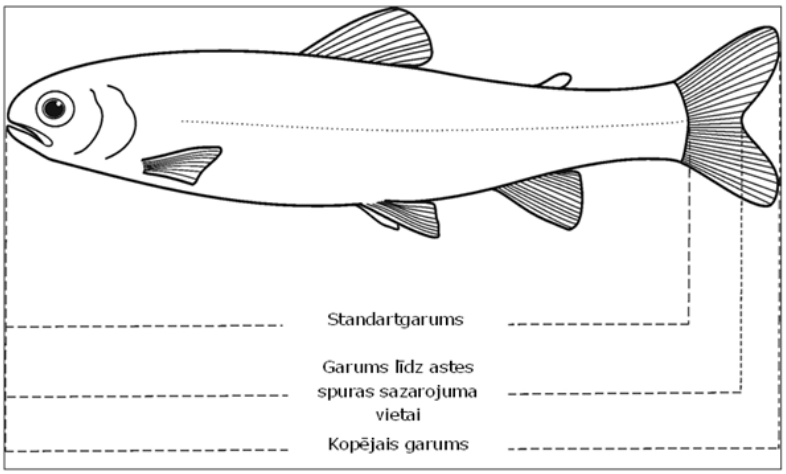
IACUC: Institucionālā dzīvnieku aprūpes un izmantošanas komiteja.

Standartgarums (SG): zivs garums, kas nomērīts no purna gala līdz pēdējā skriemeļa tālākajam galam vai astes pamatnes sānu viduslīnijas tālākajam galam. Vienkārši sakot, šajā mērījumā neņem vērā astes spuras garumu (www.fishbase.org).

Kopējais garums (KG): zivs garums no purna gala līdz astes spuras garākās daivas galam; to parasti mēra, abas daivas saspiežot gar viduslīniju. Tas ir taisnas līnijas mērījums, ko nemēra pa ķermeņa izliekuma līniju (www.fishbase.org).

1. attēls.

Dažādo izmantoto garumu ilustrācija.



ECx: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC_{50} ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

Caurplūdes tests ir tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

▼**M8**

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Noslogojums: zivju slapjmasa uz ūdens tilpumdaudzumu.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*) ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta. Norādījumi sniegti 5. un 6. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC_{50}): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija, kura ir tieši zem *LOEC* un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Piepildītība: zivju skaits uz ūdens tilpumdaudzumu.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas tādu seksuāli aktīvu mātīšu organismā, kuras dēj olas / nērš ikrus.

npa: nedēļas pēc apaugļošanas.

▼**M8**

2. Papildinājums

DAŽI PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

▼**M8**

3. Papildinājums

TESTA MEOGRT NOSACĪJUMI

1. Ieteicamās sugas	Japānas medaka (*Oryzias latipes*)
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Testa nominālā temperatūra ir 25 °C. Vidējā temperatūra katrā tvertnē testa laikā ir 24–26 °C.
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra un ~150 lm/m^2) (~150 lx)
5. Fotoperiods	16 h gaismas, 8 h tumsas
6. Noslogojums	F0: 2 pieauguši īpatņi uz replikātu; F1: sāk ar, maksimums, 20 ikriem (embrijiem) uz replikātu, pie izšķilšanās skaitu samazina līdz 12 embrijiem uz replikātu un tad 9.–10. npa, gatavojoties reproduktīvajai gāzei, saglabā 2 pieaugušus īpatņus (XX–XY vaislas pāri)
7. Minimālais izmantojamais testa kameras tilpums	1,8 l (piem., 18x9x15 cm liela testa kamera)
8. Testa šķīdumu tilpumapmaiņu skaits	Vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā, līdz 16 tilpumatjaunināšanām dienā (vai plūsmu 20 ml/min)
9. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	F0: > 12 npa, bet ieteicams nepārsniegt 16 npa
10. Organismu skaits uz replikātu	F0: 2 zivis (pāris — tēviņš un mātīte); F1: ne vairāk kā 20 zivju (ikru) uz replikātu (no F0 un F1 vaislas pāriem)
11. Apstrāžu skaits	5 apstrādes, kurām izmanto testējamo ķimikāliju, un attiecīga kontrole vai kontroles
12. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	Vismaz 6 replikāti uz katru apstrādi, kurai izmanto testējamo ķimikāliju, un vismaz 12 replikāti kontrolei un šķīdinātāja kontrolei, ja tādu izmanto (replikātu skaitu dubulto F1 reprodukcijas fāzē)
13. Organismu skaits vienā testā	Vismaz 84 zivis F0 un 504 F1 (ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 108 zivis F0 un 648 zivis F1). Īpatņu skaitu nosaka, skaitot īpatņus pēc eleiteroembriju stadijas beigām.
14. Barošanas režīms	Zivis *ad libitum* baro ar sāļūdens vēžveidīgajiem *Artemia* spp. (24 h veciem nauplijiem), vajadzības gadījumā papildus dodot komerciāli pieejamas barības pārslas (5. papildinājumā ir pieejams tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai nebūtu problēmu ar reprodukciju)

▼**M8**

15. Aerācija	Neveic, ja vien izšķīdušais skābeklis nepietuvojas < 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības
16. Atšķaidīšanas ūdens	Tīrs virszemes, akas vai rekonstituēts ūdens vai athlorēts krāna ūdens
17. Ekspozīcijas periods	Principā 19 nedēļas (no F0 līdz F2 izšķilšanās laikam)
18. Bioloģiskie beigupunkti (galvenie)	Šķilstība (F1 un F2); izdzīvotība (F1, no izšķilšanās līdz 4. npa (kāpura stadijas beigas / mazuļa stadijas sākums), no 4. līdz 9. (vai 10.) npa (no mazuļa stadijas sākuma līdz gandrīz pieaugušiem īpatņiem) un no 9. līdz 15. npa (no gandrīz pieaugušiem īpatņiem līdz pieaugušu īpatņu nonāvēšanai)); pieaugums (F1, garums un masa 9. un 15. npa); sekundārās dzimumpazīmes (F1, anālās spuras papillas 9. un 15. npa); vitelogenīns (F1, vtg iRNS vai VTG proteīns 15 npa); fenotipiskais dzimums (F1, pēc gonādu histoloģijas 15 npa); reprodukcija (F0 un F1, fekunditāte un fertilitāte 21 dienu); laiks līdz nārstam (F1) un histopatoloģija (F1, gonādu, aknu un nieru histopatoloģija 15 npa)
19. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis ≥ 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības; vidējā ūdens temperatūra visā testa laikā 24–26 °C; kontrolē(-s) veiksmīgi reproducējas ≥ 65 % mātīšu; vidējā dienas fekunditāte kontrolē(-s) ir ≥ 20 ikri; kontrolēs (vidēji) ≥ 80 % šķilstība (gan paaudzē F1, gan F2); kontrolēs izdzīvotība no izšķilšanās līdz 3. npa — ≥ 80 % (vidēji) un no 3. npa līdz paaudzes īpatņu nonāvēšanai — ≥ 90 % (vidēji) (F1), testējamās ķimikālijas koncentrācijas šķīdumā apmierinoši uzturētas ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

▼M8

4. papildinājums

NORĀDĪJUMI PAR TIPISKĀM KONTROLES VĒRTĪBĀM

Jāpiezīmē, ka šo kontroles vērtību pamatā ir ierobežots skaits validācijas pētījumu, un, pieredzei augot, tās var būt jāgroza.

Pieaugums

Visām zivīm, ko paraugo 9. (vai 10.) un 15. nedēļā pēc apaugļošanas (npa), izmēra masu un garumu. Ja ievēro šo protokolu, paredzamā slapjmasa 9. npa ir 85–145 mg tēviņiem un 95–150 mg mātītēm. Paredzamā masa 15. npa ir 250–330 mg tēviņiem un 280–350 mg mātītēm. Lai gan atsevišķu zivju rādītāji var no šiem diapazoniem būtiski novirzīties, tad, ja no tiem būtiski novirzās vidējā kontroles īpatņu masa, it sevišķi tad, ja tā ir mazāka, ir pamats domāt, ka ir problēmas ar barošanu, temperatūras regulēšanu, ūdens kvalitāti, slimībām vai kādu šo faktoru kombināciju.

Šķilstība

Veiksmīga šķilstība kontrolēs parasti ir ap 90 %, tomēr neparasti nav pat tik zemi rādītāji kā 80 %. Ja šķilstība ir zem 75 %, iespējams, ikri attīstības stadijā nav pietiekami kustināti vai nav pienācīgi aprūpēti, piem., nav laikus novākti nedzīvie ikri, līdz ar to sākusies sēnīšu infestācija.

Izdzīvotība

Izdzīvotības rādītāji līdz 3. npa un pēc 3. npa kontrolēs parasti ir vismaz 90 %, bet satraukumam nav pamata arī tad, ja izdzīvotība agrīnajās dzīves cikla stadijās kontrolēs ir pat tikai 80 %. Bažas raisa izdzīvotības rādītāja noslīdēšana zem 80 % (kontrolēs), kas var liecināt, ka akvārijs netiek pietiekami tīrīts, līdz ar to zivju kāpuri mirst no slimībām vai skābekļa trūkuma zema izšķīdušā skābekļa līmeņa dēļ. Nāves cēloņi var būt arī tvertnes tīrīšanas laikā radītas traumas un zivju kāpuru iekļūšana ūdens novades sistēmā.

Vitelogenīna gēns

Lai gan vitelogenīna (vtg) gēna absolūtie līmeņi, izteikti kopijās uz ng kopējās iRNS, dažādās laboratorijās var ievērojami atšķirties izmantoto procedūru vai instrumentu atšķirību dēļ, vtg līmenim kontroles mātītēs vajadzētu būt aptuveni 200 reizes lielākam nekā kontroles tēviņos. Šī attiecība bieži vien sasniedz pat 1 000–2 000, bet, ja tā ir zem 200, ir pamats aizdomām, ka paraugs ir kontaminēts vai ir problēmas ar izmantoto procedūru un/vai reaģentiem.

Sekundārās dzimumpazīmes

Tēviņiem normālais sekundāro dzimumpazīmju (kopējais to anālās spuras staru segmentu skaits, kam ir papillas) diapazons 9–10 npa ir 40–80 segmenti. Līdz 15. npa kontrolēs tēviņiem šim diapazonam vajadzētu būt aptuveni 80–120, bet mātītēm — 0. Retos gadījumos dažiem tēviņiem neizskaidrojamā kārtā papillas 9. npa vēl nav attīstījušās, bet, tā kā visiem kontroles tēviņiem tās attīstās līdz 15. npa, šīs parādības cēlonis, visticamāk, ir attīstības aizkavēšanās. Ja kontrolē papillas ir novērojamas mātītēm, populācijā ir XX tēviņi.

▼**M8**

XX tēviņi

Normālā XX tēviņu incidence kultūrā 25 °C temperatūrā ir aptuveni 4 % vai mazāk, un tā pieaug, temperatūrai palielinoties. XX tēviņu proporcija populācijā jātiecas minimalizēt. Tā kā XX tēviņu incidencei konstatējams ģenētisks komponents un tāpēc tā ir pārmantojama, iedarbīgs līdzeklis, kā samazināt XX tēviņu incidenci populācijā, ir audzējamā krājuma monitorēšana un rūpēšanās, lai krājums netiktu pavairots ar XX tēviņiem.

Nārsts

Nārsts kontroles replikātos pirms fekunditātes novērtēšanas būtu jāmonitorē ik dienas. Nārsta pazīmes kontroles pāros var kvalitatīvi novērtēt vizuāli. Līdz 12.–14. npa nārstojušai vajadzētu būt lielākajai daļai kontroles pāru. Ja līdz šim laikam nārstojošo pāru skaits ir mazs, ir pamats bažām par zivju veselību, briedumu vai labklājību.

Fekunditāte (potenciālā auglība)

Veselas, labi barotas medakas 12–14 npa parasti nērš ikrus ik dienas (15 līdz 50 ikrus dienā). 16 no ieteicamajiem 24 kontroles vaislas pāriem (> 65 %) vajadzētu iznērst vairāk nekā 20 ikrus dienā uz vienu pāri, un šis rādītājs var sasniegt pat aptuveni 40 ikrus dienā. Mazāka vērtība var liecināt, ka vaislas pāri ir nenobrieduši, nepietiekami baroti vai neveseli.

Fertilitāte (faktiskā auglība)

Kontroles vaislas pāru auglīgo ikru proporcija parasti ir ap 90 %, un nav reti gadījumi, kad tās sasniedz vai pārsniedz 95 %. Ja kontroles ikru fertilitātes rādītājs nesasniedz 80 %, ir pamats bažām, ka dzīvnieki ir neveseli vai audzēšanas apstākļi ir neoptimāli.

▼**M8**

5. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMA PIEMĒRS

1. tabulā ir sniegts tāda barošanas režīma piemērs, kas nodrošina pietiekamu augšanu un attīstību, lai nebūtu problēmu ar reprodukciju. Novirzes no šā barošanas režīma var būt pieņemamas, bet ir ieteicams tās testēt, lai pārliecinātos, ka novērojama pieņemama augšana un reprodukcija. Ievērojot ieteicamo barošanas režīmu, pirms testa sākšanas jānosaka sāļūdens garneļu sausmasa konkrētā biezas sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā. To var izdarīt, nosverot konkrētu biezās sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumu, kas uz iepriekš nosvērtām plātnēm 24 stundas žāvēts 60 °C temperatūrā. Lai ņemtu vērā sāls daudzumu suspensijā, izžāvē un nosver identisku suspensijā izmantotā sāls šķīduma tilpumdaudzumu un to atņem no izžāvētās sāļūdens garneļu suspensijas masas. Alternatīva ir sāļūdens garneles pirms žāvēšanas izfiltrēt un noskalot ar destilētu ūdeni; tad nav vajadzības mērīt "tukšā sāls parauga" masu. Iegūto sāļūdens garneļu sausmasu pēc tabulas pārrēķina biezās sāļūdens garneļu suspensijas tilpumdaudzumā, kas dodams katrai zivij. Turklāt, lai pārliecinātos, ka zivīm tiek dots pareizais sāļūdens garneļu sausmasas daudzums, biezo sāļūdens garneļu suspensijas alikvotas ieteicams ik nedēļas nosvērt.

1. tabula.

Barošanas režīma piemērs

Laiks (pēc izšķilšanās)	Sāļūdens garneles (mg sausmasas uz zivi dienā)
1. diena	0,5
2. diena	0,5
3. diena	0,6
4. diena	0,7
5. diena	0,8
6. diena	1,0
7. diena	1,3
8. diena	1,7
9. diena	2,2
10. diena	2,8
11. diena	3,5
12. diena	4,2
13. diena	4,5
14. diena	4,8
15. diena	5,2
16.–21. diena	5,6

▼**M8**

Laiks (pēc izšķilšanās)	Sāļūdens garneles (mg sausmasas uz zivi dienā)
4. nedēļa	7,7
5. nedēļa	9,0
6. nedēļa	11,0
7. nedēļa	13,5
8. nedēļa (nonāvēšana)	22,5

▼**M8**

6. Papildinājums

IKRU INKUBĀCIJAS KAMERU PARAUGI

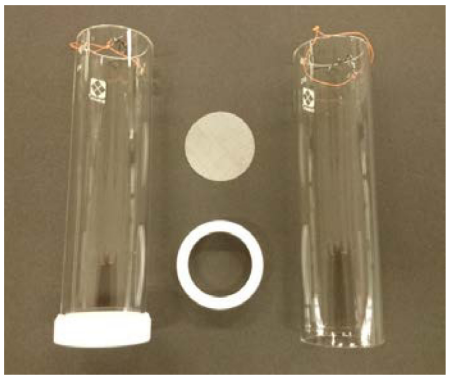
A piemērs





Šis inkubators sastāv no transversāli sadalītas stikla centrifūgas mēģenes, ko savieno nerūsošā tērauda manšete un vietā notur uzskrūvējamais centrifūgas vāciņš. Cauri vāciņam iet neliels stikla vai nerūsošā tērauda stobriņš, kuru novieto netālu no mēģenes apaļā dibena un pa kuru viegli laiž gaisa burbulīšus, lai ikrus suspendētu un mazinātu risku, ka starp tiem izplatīsies saprofītiskas sēnīšinfekcijas, reizē atvieglojot ķimikāliju apmaiņu starp inkubatoru un tvertni, kurā tas atrodas.

B piemērs



▼**M8**



Šis inkubators sastāv no cilindriska stikla stobriņa (diametrs: 5 cm, garums: 10 cm) un nerūsošā tērauda stieples sieta (0, 25 φ un 32 meši), kas piestiprināts stobriņa apakšai ar PTFE gredzenu. Inkubatorus tvertnēs iekar no paceļama stieņa un vertikāli krata (aptuveni 5 cm amplitūdā) medakas ikriem piemērotā ciklā (aptuveni reizi 4 sekundēs).

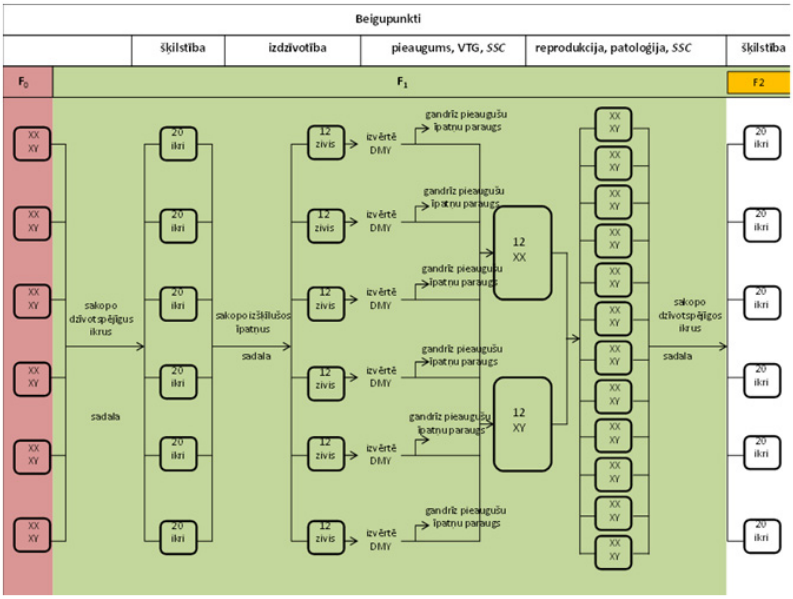
▼M8

7. Papildinājums

REPLIKĀTU SAKOPOŠANAS UN SADALĪŠANAS SHĒMA TESTĒŠANAS METODEI MEOGRT

1. attēls.

Replikātu sakopošana un sadalīšana testā *MEOGRT*. Attēlā redzama viena apstrāde vai puse no kontroles. Sakopošanas dēļ replikātu identitāte visā testā nav vienāda. Jāņem vērā, ka jēdziens "ikri" attiecas uz dzīvotspējīgiem apaugļotiem ikriem (kas ekvivalenti embrijiem).



Apstrādes un replikācija

Testēšanas metodē ieteicams izmantot piecas apstrādes ar testējamo ķimikāliju (izmantojot tehniskās tīrības pakāpes materiālu) un negatīvo kontroli. Replikātu skaits uz apstrādi visā *MEOGRT* laikā nav vienāds, un replikātu skaits kontrolē ir divreiz lielāks nekā katrā atsevišķajā apstrādē. Paaudzē F0 katrā apstrādē ar testējamo ķimikāliju ir seši replikāti, savukārt negatīvajā kontrolē ir 12 replikāti. Ir ļoti ieteicams neizmantot šķīdinātājus, bet, ja tos tomēr izmanto, *MEOGRT* pārskatā iekļaujams gan šķīdinātāja izmantošanas, gan šķīdinātāja izvēles pamatojums. Ja izmanto šķīdinātāju, turklāt nepieciešamas divu veidu kontroles — a) šķīdinātāja kontrole un b) negatīvā kontrole. Katrā no abām kontrolgrupām visos *MEOGRT* laika grafika punktos jābūt visiem vajadzīgajiem replikātiem. Kamēr testa organismi attīstās paaudzē F1 (un F2 — līdz izšķilšanās brīdim), šī replikātu struktūra nemainās. Tomēr, kad organismi ir pieauguši un tiek sagatavoti paaudzes F1 vaislas pāri, reproduktīvo pāru replikātu skaitu uz apstrādi optimālā gadījumā dubulto; tāpēc katrā apstrādē ar testējamo ķimikāliju ir līdz 12 replikātpāriem, bet kontrolgrupā — 24 replikātpāri (un šķīdinātāja kontrolē vēl 24, ja tāda vajadzīga). F1 pāru embriju izšķilšanos nosaka pēc tās pašas replikātu struktūras kā F0 pāru embriju gadījumā — sākotnēji seši replikāti uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 12 uz kontrolgrupu.

▼**M8**

8. Papildinājums

ANĀLĀS SPURAS PAPILLU SKAITĪŠANA

Galvenie materiāli un reaģenti

— Stereomikroskops (ar kameru vai bez tās)

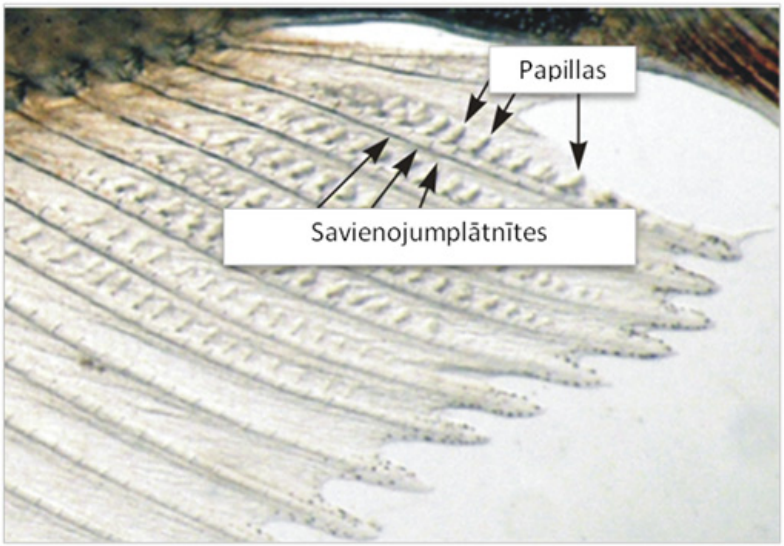
— Fiksators (piem., Deividsona; izmantot Buēna šķīdumu nav ieteicams), ja skaitīšanu neveic no attēla

Procedūras

Pēc nekropsijas anālo spuru nofotografē, lai būtu ērti izskaitīt anālās spuras papillas. Lai gan ieteicamā metode ir ar fotografēšanu, ir iespējams arī anālo spuru aptuveni 1 minūti fiksēt ar Deividsona fiksatoru vai citu piemērotu fiksatoru. Lai izskaitīt papillas būtu vieglāk, ir svarīgi, lai anālā spura fiksācijas laikā būtu izstiepta plakana. Ķermeni ar anālo spuru var Deividsona fiksatorā vai citā piemērotā fiksatorā turēt līdz analīzei. Izskaita, cik savienojumplātnītēm (sk. **1. attēlu**) ir papillas, kas iznāk no savienojumplātnītes aizmugurējās malas.

1. attēls.

Anālās spuras papillas



▼M8

9. Papildinājums

DETALIZĒTS MEOGRT LAIKA GRAFIKS

1.–3. testa nedēļa (F0)

Nārstojošas paaudzes F0 zivis, kas atbilst atlases kritērijiem (sk. 16.–20. punktu) trīs nedēļas eksponē testējamajai ķimikālijai, lai attīstības laikā būtu eksponētas gametas un gonādu audi. Katrā replikāttvertnē tur vienu vaislas pāri (kurā ir viena XX mātīte un viens XY tēviņš). Iznērstos ikrus savāc, saskaita un 21 dienu (no 1. testa dienas) novērtē to fertilitāti.

4. testa nedēļa (F0 un F1)

Ir vēlami apaugļotus dzīvotspējīgus ikrus (embrijus) savākt vienā dienā; tomēr, ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katrai apstrādei sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Ik dienas pārbauda un reģistrē apaugļoto ikru (embriju) mirstību. Nedzīvos ikrus no inkubatoriem izņem (par to, ka apaugļoti ikri ir nedzīvi, jo īpaši agrīnās stadijās, var liecināt izteikts caurspīdības zudums un krāsas maiņa, ko rada olbaltumvielu koagulācija un/vai izgulsnēšanās, kā dēļ tie kļūst balti un necaurredzami; *OECD* (2010)).

Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvāc arī otrā dienā, tāpat jārīkojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru. Vēl ir iespējams paaudzē F0 apstrādei un kontrolēm ņemt vairāk vaislas pāru, lai iegūtu vairāk ikru un varētu sasniegt ieteicamos 20 ikrus uz replikātu.

24. testa dienā paaudzes F0 vaislas pārus humāni nonāvē un reģistrē to masu un garumu. Vajadzības gadījumā F0 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F1 varētu iegūt vēlreiz.

5.–6. testa nedēļa (F1)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Katru dienu jaunizšķīlušos mazuļus sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala pa konkrētas apstrādes mazuļu replikāttvertnēm, kur nav vairāk kā 12 izšķīlušos mazuļu. To dara šādi: pēc nejaušības principa izvēlas jaunizšķīlušos mazuļus un tos nešķirojot pēc kārtas liek konkrētās apstrādes replikātos, līdz visos apstrādes replikātos ir 12 jaunizšķīlušies mazuļi. Ja mazuļu nav pietiekami daudz visu replikātu aizpildīšanai, cenšas panākt, lai pēc iespējas daudzos replikātos būtu 12 mazuļi F1 fāzes sākšanai.

Ikrus, kas kontrolē nav izšķīlušies līdz divkāršotai medianālajai dienai, uzskata par dzīvotnespējīgiem un atmet. Katra replikāta jaunizšķīlušos mazuļu skaitu reģistrē un aprēķina šķilstību.

▼M8

7.–11. testa nedēļa (F1)

Visos replikātos ik dienas pārbauda un reģistrē zivju kāpuru izdzīvotību. 43. testa dienā reģistrē izdzīvojušo zivju skaitu katrā replikātā, kā arī replikātā sākotnēji ievietoto jaunizšķīlušos mazuļu skaitu (nomināli divpadsmit). Tā var aprēķināt, cik procenti dzīvnieku pēc izšķilšanās sasniedz gandrīz pieaugušu īpatņu stadiju.

12. testa nedēļa (F1)

78.–85. testa dienā no katras zivs astes spuras paņem nelielu paraugu, lai noteiktu konkrētā īpatņa genotipisko dzimumu (t. i., veic spuru paraugošanu). Izmantojot šo informāciju, izveido vaislas pārus.

Trīs dienu laikā pēc katras zivs genotipiskā dzimuma noteikšanas pēc nejaušības principa izraugās 12 vaislas pārus uz katru apstrādi un 24 pārus uz katru kontroli. No katra replikāta pēc nejaušības principa izraugās divas XX un divas XY zivis, tās sakopo pēc dzimuma un tad no to vidus pēc nejaušības principa izveido vaislas pāri (t. i., XX–XY pāri). Izveido vismaz 12 replikātus uz katru apstrādi ar ķimikāliju un vismaz 24 replikātus kontrolei (viens vaislas pāris uz replikātu). Ja replikātā sakopošanai vai nu divu XX zivju, vai divu XY zivju nav, zivis ar attiecīgo dzimuma genotipu ņem no citiem attiecīgās apstrādes replikātiem.

Atlikušās zivis (ne vairāk kā 8 uz replikātu) humāni nonāvē un paraugo, lai noskaidrotu dažādos gandrīz pieaugušo īpatņu beigupunktus. Visu gandrīz pieaugušo īpatņu paraugu *dmy* datus (XX vai XY) saglabā, lai nodrošinātu, ka visus beigupunktu datus ir iespējams sasaistīt ar katras konkrētās zivs ģenētisko dzimumu.

13.–14. testa nedēļa (F1)

Gandrīz pieaugušo īpatņu vaislas pāriem pieaugot, ekspozīciju turpina. 98. testa dienā (t. i., dienā pirms dienas, kurā sāk ikru ievākšanu), ikrus gan izņem no akvārijiem, gan noņem no mātītēm.

15.–17. testa nedēļa (F1)

Katrā replikātā 21 dienu pēc kārtas ievāc iznērstos ikrus un novērtē to fekunditāti un fertilitāti.

18. testa nedēļa (4. testa nedēļas atkārtojums) (F1 un F2)

120. testa dienas rītā katrā replikāttvertnē ievāc ikrus. Ievāktos ikrus novērtē un tos katra vaislas pāra ikrus, kas ir apaugļoti, pēc pavedienu noņemšanas sakopo pēc apstrādes un sistemātiski sadala ikru inkubācijas kamerās (20 apaugļoti ikri uz inkubatoru). Inkubatorus var ievietot atsevišķās "inkubatortvertnēs", ko sagatavo katrai apstrādei, vai replikāttvertnē, kurā izšķīlušies kāpuri paliks pēc izšķilšanās. Ir vēlami embrijus savākt vienā dienā; tomēr, ja embriju nav pietiekami daudz, tos var savākt divās dienās. Ja tos savāc divās dienās, visus apstrāžu embrijus, kas savākti pirmajā dienā, sakopo ar tiem, ko savāc otrajā dienā. Tad visus katras apstrādes sakopotos embrijus pēc nejaušības principa sadala pa

▼M8

replikātinkubatoriem (20 embriji uz inkubatoru). Piezīme. Ja kaut vienai apstrādei ikri jāvāc arī otrā dienā, tāpat jārīkojas ar visām apstrādēm (arī kontrolēm). Ja pēc otrās ievākšanas dienas embriju skaits kādā apstrādē nav pietiekams 20 embrijiem uz inkubatoru, konkrētās apstrādes embriju skaitu samazina līdz 15 embrijiem uz inkubatoru. Ja nav arī 15 embriju uz inkubatoru, replikātinkubatoru skaitu samazina tiktāl, ka embriju pietiek 15 embrijiem uz inkubatoru.

121. testa dienā (vai 122. testa dienā, lai būtu drošība, ka paaudze F2 sākta veiksmīgi) F1 vaislas pārus humāni nonāvē un analizē, lai noskaidrotu pieaugušo īpatņu beigupunktus. Vajadzības gadījumā F1 vaislas pārus var turēt vēl 1–2 dienas, lai paaudzi F2 varētu iegūt vēlreiz.

19.–20. testa nedēļa (F2)

Lai veicinātu izšķilšanos, inkubatoros esošo ikru kustināšanu vienu līdz divas dienas pirms gaidāmās izšķilšanās izbeidz vai samazina. Ja testu izbeidz, kad beidzas F2 izšķilšanās, izšķīlušos mazuļos katru dienu saskaita un atmet. (Embrijus, kas nav izšķīrušies pat pēc ilgākas inkubācijas, kas kontrolei ir divkārša medianālā izšķilšanās diena, uzskata par dzīvotnespējīgiem.)

▼M8

10. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

MEOGRT iegūtie bioloģiskie dati pēc veida nav unikāli, un līdzīgu datu (izņemot patoloģijas datus) analizēšanai ir izstrādātas daudzas piemērotas statistiskās metodes atkarībā no datu īpašībām, tostarp normalitātes, dispersiju homogenitātes, tā, vai pētījuma plāns ir piemērots hipotēzes testēšanai vai regresijas analīzei, parametriskajiem vai neparametriskajiem testiem utt. Ieteicamās statistiskās analīzes principā atbilst ESAO ieteikumiem attiecībā uz ekotoksiskuma datiem (*OECD* 2006) un *MEOGRT* datu analīzes lēmumu pieņemšanas plūsmas diagramma ir sniegta 2. attēlā.

Tiek pieņemts, ka visbiežāk datu kopu uzrādītās atbildreakcijas būs monotonas. Turklāt jāapdomā, vai izmantot vienpusēju vai abpusēju statistisko testu. Ja vien nav kāda bioloģiska pamata domāt, ka vienpusējs tests būtu nepiemērots, ieteicams izvēlēties vienpusēju testu. Lai gan nākamajā sadaļā ieteikti konkrēti statistiskie testi, tomēr, ja konkrēto *MEOGRT* iegūto datu apstrādei ir izstrādātas piemērotākas un/vai jaudīgākas statistiskās metodes, tad, lai pilnvērtīgi izmantotu šīs priekšrocības, izmanto attiecīgos statistiskos testus.

MEOGRT dati jāanalizē par katru genotipisko dzimumu atsevišķi. Ir divas stratēģijas, kā analizēt datus par zivīm ar invertētu dzimumu (XX tēviņiem vai XY mātītēm): 1) visus datus par dzimuminvertētām zivīm visā testā cenzēt, izņemot datus par dzimuminversijas prevalenci katrā replikātā; 2) visus datus par visām dzimuminvertētajām zivīm datu kopā paturēt un analizēt pēc genotipa.

Histopatoloģiskie dati

Histopatoloģiskos datus pārskatā norāda smaguma atzīmju formā, un to izvērtē ar jaunizstrādātu statistisko procedūru — *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (*RSCABS*), (*Green et al*., 2014). Rao–Skota korekcija ļauj saglabāt informāciju par replikāciju; procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka smaguma atzīmes palielināsies, pieaugot apstrādes koncentrācijām. *RSCABS* rezultāti norāda, kurām apstrādēm katras diagnozes gadījumā ir lielāka patoloģiju prevalence nekā kontrolēm un kāds ir asociētais smaguma līmenis.

Dati par fekunditāti

Fekunditātes datus analizē, izmantojot descendentu Džonkhīra–Terpstras vai Viljamsa testu, kurā nosaka apstrādes efektus, ar nosacījumu, ka dati liecina par monotonu atbildreakciju uz koncentrāciju. Izmantojot descendentu testu, visus salīdzinājumus izdara nozīmības līmenī 0,05 bez korekcijām pēc veikto salīdzinājumu skaita. Paredzams, ka dati atbildīs monotonai atbildeakcijai uz koncentrāciju, bet par to var pārliecināties, vai nu datus apskatot, vai izveidojot apstrāžu vidējo vērtību lineāros un kvadrātiskos kontrastus pēc datu hierarhizēšanas. Ja vien nav tā, ka kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenozīmīgs, veic trenda testu. Pretējā gadījumā, ja dati ir sadalīti normāli un dispersijas ir homogēnas, apstrāžu efektus nosaka ar Daneta testu. Ja šīs prasības nav izpildītas, izmanto Dannas testu ar Bonferroni–Holma [*Bonferroni–Holm*] korekciju. Visus norādītos testus veic neatkarīgi no vispārīga F vai Kraskela–-Volisa [*Kruskal-Wallis*] testa. Sīkāku informāciju sk. *OECD* 2006.

▼M8

Ja tam ir statistisks pamatojums, var izmantot alternatīvas metodes, piem., vispārinātu lineāru modeli ar Puasona kļūdām attiecībā uz ikru skaitīšanu (bez transformācijas) (*Cameron and Trividi*, 2013). Ja izmanto alternatīvu pieeju, ieteicams lūgt statistikas speciālista padomu.

Dienišķa ikru skaitīšana vienas paaudzes ietvaros

ANOVA modeli iegūst ar Y=laiks*laiks+apstrāde+*apstrāde+laiks*apstrāde+*-laiks*apstrāde ar nejaušajiem efektiem, kuri ir replikāts(paaudze*apstrāde) un laiks*replikāts(apstrāde), kas pieļauj vairākām paaudzēm abu tipu nevienādās dispersijas elementus. Šeit "laiks" apzīmē ikru skaitīšanas biežumu (piem., dienu vai nedēļu). Tā ir atkārtotu mērījumu analīze: atkārtotos mērījumus veido korelācijas starp vienu un to pašu replikātu novērojumiem.

Apstrādes galvenos efektus testē ar Daneta (vai Daneta–Sjui) testu, kurā veic korekcijas pēc salīdzinājumu skaita. Ir vajadzīgas korekcijas attiecībā uz galveno efektu "paaudze" vai "laiks", jo šo divu efektu gadījumā "kontroles" līmeņa nav un potenciāli interesanti var būt salīdzināt katru līmeņu pāri. Šo divu galveno efektu gadījumā, ja F tests attiecībā uz galveno efektu ir nozīmīgs līmenī 0,05, šā faktora līmeņu pārveida salīdzinājumus var testēt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām.

Modelis ietver divu un triju faktoru mijiedarbību tā, ka galvenais efekts attiecībā uz laiku var nebūt nozīmīgs, lai gan laikam ir ievērojama ietekme uz rezultātiem. Tā, ja divu vai trīs faktoru mijiedarbība, kurā iesaistīts laiks, ir nozīmīga līmenī 0,05, laika līmeņu salīdzinājumus nozīmības līmenī 0,05 var pieņemt bez tālākām korekcijām.

Tad seko F testi, kuros noskaidro apstrādes nozīmību laikā, — tā sauktie *ANOVA* tabulas "griezumi" [*slices*]. Piemēram, ja griezums, kas atbilst paaudzes F1 apstrādei un laikam 12, ir nozīmīgs līmenī 0,05, tad pārveida salīdzinājumus attiecībā uz F1 apstrādi un laiku 12 var pieņemt līmenī 0,05 bez tālākām korekcijām. Tas pats attiecas uz testiem attiecībā uz laiku paaudzes F1 un apstrādes kontekstā un paaudzi konkrēta laika un apstrādes kontekstā.

Visbeidzot, ja salīdzinājums neietilpst nevienā no minētajām kategorijām, salīdzinājumi jākoriģē atbilstoši p vērtībām, izmantojot Bonferroni–Holma korekciju. Plašāka informācija par šādu modeļu analīzi atrodama *Hocking* (1985) un *Hochberg and Tamhane* (1987).

Vēl viena iespēja ir reģistrēt jēldatus un tos pētījuma pārskatā norādīt kā katras dienas fekunditāti (ikru skaits) uz replikātu. Pēc jēldatiem aprēķina katra replikāta vidējo vērtību un tai veic kvadrātsaknes transformāciju. Transformētajām replikātu vidējām vērtībām piemēro vienvirziena *ANOVA*, bet pēc tam Daneta kontrastus. Var būt lietderīgi katras apstrādes un/vai replikāta fekunditātes datus apskatīt arī vizuāli, izmantojot izkliedes diagrammu, kas ilustrē datus attiecībā pret laiku. Tā var neformāli novērtēt iespējamos efektus laikā.

Visi citi bioloģiskie dati

Visu statistisko analīžu pamatā ir pieņēmums, ka, ja devas izraudzītas pienācīgi, dati būs monotoni. Tātad tiek pieņemts, ka dati ir monotoni, un to monotonitāti formāli izvērtē ar lineāriem un kvadrātiskiem kontrastiem. Ja dati ir monotoni, ieteicams izmantot Džonkhīra–Terpstras replikātu mediānu trenda testu (*OECD* 2006 ieteikums). Ja kvadrātiskais kontrasts ir nozīmīgs, bet lineārais — nenozīmīgs, dati uzskatāmi par nemonotoniem.

▼**M8**

Ja dati ir nemonotoni, it sevišķi tāpēc, ka atbildreakcija uz vienu vai divām augstāko līmeņu apstrādēm ir mazāka, jāapsver iespēja datu kopu cenzēt, proti, to analizēt, šīs apstrādes neņemot vērā. Šis lēmums būs jāpieņem, profesionāli izvērtējot visus pieejamos datus, it sevišķi datus, kas liecina par acīmredzamu toksicitāti šajos apstrādes līmeņos.

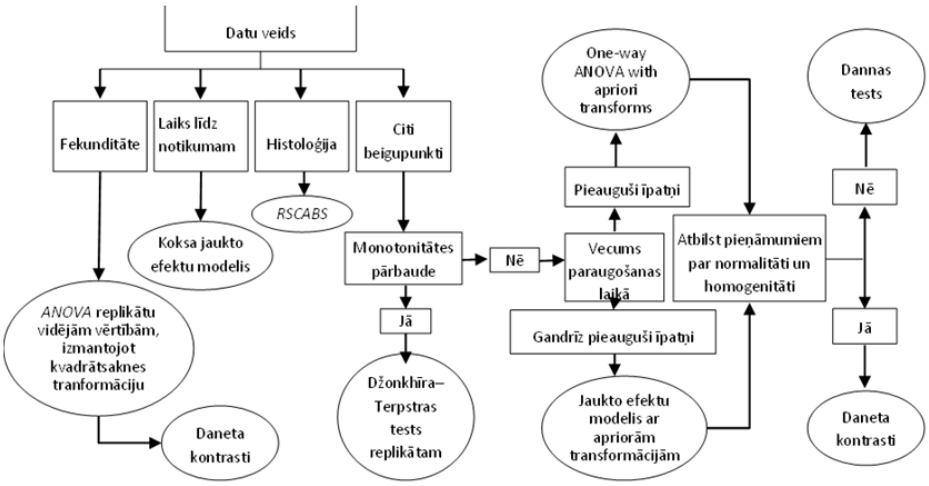
Nav ieteicams transformēt garuma un masas datus, lai gan tas dažkārt var būt nepieciešams. Savukārt attiecībā uz vitelogenīna datiem ieteicama logaritmiska transformācija, attiecībā uz SDzP datiem (anālās spuras papillas) — kvadrātsaknes transformācija; attiecībā uz datiem par šķilstības rādītāju, izdzīvotības procentuālo daļu, dzimumu attiecību un auglīgo ikru procentuālo daļu — arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Laiks līdz izšķilšanās brīdim un laiks līdz pirmajam nārstam jāuztver kā dati par laiku līdz notikumam, un atsevišķu embriju neizšķilšanās konkrētajā periodā vai replikātu nenārstošana jāuztver kā labēji cenzēti dati. Laiks līdz izšķilšanās brīdim jāaprēķina no katra replikāta medianālās izšķilšanās dienas. Šos beigupunktus aprēķina, izmantojot Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli jauktiem efektiem.

Bioloģiskajos datos par pieaugušo īpatņu paraugiem ir viens mērījums uz replikātu, proti, katrā replikātakvārijā ir viena XX zivs un viena XY zivs. Tāpēc ieteicams replikātu vidējām vērtībām piemērot vienvirziena *ANOVA*. Ja ir spēkā *ANOVA* pieņēmumi (normalitāte un dispersijas homogenitāte, kas *ANOVA* atlikumos novērtēta attiecīgi ar Šapiro–Vilka [*Shapiro–Wilk*] testu un Levīna [*Levene*] testu), tad, lai noteiktu apstrādes, kas atšķiras no kontroles, izmanto Daneta kontrastus. Savukārt, ja *ANOVA* pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu. Līdzīgu procedūru teicams izmantot attiecībā uz datiem procentuālo daļu formā (fertilitāte, šķilstība un izdzīvotība).

Bioloģiskajos datos par gandrīz pieaugušo īpatņu paraugiem ir 1 līdz 8 mērījumi uz replikātu, proti, genotipiskā dzimuma vidējo vērtību replikātā var veidot dažāds īpatņu skaits. Tāpēc ir ieteicams izmantot *ANOVA* modeli jauktiem efektiem, bet pēc tam Daneta kontrastus, ja spēkā normalitātes un dispersijas homogenitātes pieņēmumi (attiecībā uz jaukto efektu *ANOVA* atlikumiem). Ja pieņēmumi nav spēkā, tad, lai noteiktu, kuras apstrādes atšķiras no kontroles, izmanto Dannas testu.

2. attēls.

Plūsmas diagramma ar MEOGRT datu analīzei ieteicamajām statistiskajām procedūrām.



▼**M8**

LITERATŪRA

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. ABINIEKU KĀPURU AUGŠANAS UN ATTĪSTĪBAS TESTS (*LAGDA*)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir ekvivalenta ESAO testēšanas vadlīnijai Nr. 241 (2015). Vajadzībai izstrādāt un validēt testu, ar kuru iespējams konstatēt un raksturot, kādas nelabvēlīgas sekas rada abinieku ekspozīcija toksiskām ķimikālijām, pamatā ir bažas, ka ķimikāliju līmeņi vidē var atstāt nelabvēlīgu ietekmi gan uz cilvēku, gan citu dzīvo dabu. ESAO testēšanas vadlīnijā "Abinieku kāpuru augšanas un attīstības tests (*LAGDA*)" aprakstīts toksiskuma tests, kurā izmanto tādas sugas abiniekus, kas ļauj ņemt vērā augšanu un attīstību no apaugļošanas līdz agrīnajai mazuļa stadijai. Šajā testā (kura garums parasti ir 16 nedēļas) tiek novērtēta agrīnā attīstība, metamorfoze, izdzīvotība, pieaugums un daļēja reproduktīvās sistēmas nobriešana. Ar to var novērtēt arī dažādus citus beigupunktus, kas dod iespēju diagnostiski izvērtēt domājamas endokrīni disruptīvas ķimikālijas (EDĶ) vai citu veidu ontoģenētiskos un reproduktīvos toksikantus. Šajā testēšanas metodē aprakstītās metodes pamatā ir validācijas darbs, ko ar Āfrikas piešvardi (*Xenopus laevis*) veikusi ASV Vides aizsardzības aģentūra (ASV VAA), un palīgdarbs Japānā (1). Lai gan augšanas un attīstības testēšanas protokolam varētu izmantot arī citu sugu abiniekus (svarīgs priekšnoteikums ir spēja noteikt ģenētisko dzimumu), konkrētās metodes un novērojamie beigupunkti, kas izklāstīti šajā testēšanas metodē, attiecas tikai uz *Xenopus laevis*.

2. *LAGDA* ir augstākas pakāpes abinieku tests, kas ļauj iegūt pilnīgāku koncentrācijas–atbildreakcijas informāciju par nelabvēlīgo ietekmi un tāpēc ir piemērots apdraudējumu apzināšanai un raksturošanai un ekoloģisko risku novērtēšanai. Tests atbilst ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālā satvara 4. līmenim, kurā ietilpst *in vivo* testi, kas nodrošina arī datus par nelabvēlīgo ietekmi uz endokrīni relevantiem beigupunktiem (2). Vispārējais eksperimenta plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. stadijā pēc Nivkopa un Fabera [*Nieuwkoop and Faber* (NF)] (3), eksponēt testējamajai ķimikālijai ne mazāk kā četrās dažādās koncentrācijās (parasti vismaz puslogaritmiskos intervālos), izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā (≤ 45 dienas pēc apaugļošanas, parasti aptuveni 45 dienas (dpa)). Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas gaitā izvērtētie beigupunkti (starpposma apakšparaugā un galīgajā paraugā, kad tests noslēdzas) ietver beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti, — mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa) —, kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem fizioloģiskajiem procesiem. Šajā metodē galvenais uzsvars likts uz iespējamu populācijas līmenī relevantu ietekmi (proti, nelabvēlīgu ietekmi uz izdzīvotību, attīstību, augšanu un reproduktīvo attīstību), lai varētu aprēķināt nenovērojamas ietekmes koncentrāciju (*NOEC*) vai efektīvo koncentrāciju, kas mērāmajā beigupunktā rada × % izmaiņu (ECx). Tomēr jāatzīmē, ka uz ECx balstītas pieejas reti ir piemērotas šādiem lieliem pētījumiem, kuros palielināt testējamo koncentrāciju skaitu, lai varētu noteikt vajadzīgo ECx, var būt nepraktiski. Tāpat jāatzīmē, ka metode neaptver pašu reproduktīvo posmu. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Tā kā testētas salīdzinoši nedaudzas ķimikālijas un šā visai sarežģītā testa validēšanā iesaistījušās salīdzinoši nedaudzas laboratorijas, turklāt eksperimentu datos līdz šim nav dokumentēta interlaboratoriskā reproducējamība, ir gaidāms, ka tad, kad būs pieejami pietiekami daudzi pētījumi, lai varētu

▼**M8**

novērtēt šā jaunā pētījuma plāna ietekmi, ESAO testēšanas vadlīnija Nr. 241 tiks pārskatīta un vajadzības gadījumā grozīta, ņemot vērā gūto pieredzi. *LAGDA* ir svarīgs tests, kas ļauj novērtēt abinieku populācijas sarukumu iespējamos cēloņus, izvērtējot ietekmi, ko rada ekspozīcija ķimikālijām jutīgajā kāpuru stadijā, kurā ietekme uz izdzīvotību un attīstību, arī normālu reproduktīvo orgānu attīstību, var atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz populācijām.

4. Tests ir izstrādāts tā, lai detektētu gan endokrīno, gan neendokrīno mehānismu apikālo ietekmi, un tajā ir diagnostiskie beigupunkti, kas ir daļēji specifiski svarīgām endokrīnajām modalitātēm. Jāatzīmē, ka līdz *LAGDA* izstrādei nebija neviena validēta testa, kas pildītu šo funkciju attiecībā uz abiniekiem.

5. Ir svarīgi, lai pirms testa sākšanas būtu pieejama informācija par testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām, īpaši tālab, lai varētu iegūt stabilus ķimikālijas šķīdumus. Svarīgi ir arī tas, lai būtu pieejama pietiekami jutīga analītiskā metode testējamās ķimikālijas koncentrāciju verificēšanai. Lai testam dotu pietiekamu jaudu, kas ļautu izvērtēt tādus populācijas līmenī relevantus beigupunktus kā pieaugums, attīstība un reproduktīvais briedums, aptuveni 16 nedēļas ilgajā testā vajadzīgi kopā 480 dzīvnieki, t. i., *X. laevis* embriji (vai, ja izmanto šķīdinātāja kontroli, 640 embriji).

6. Pirms testēšanas metodes izmantošanas kāda maisījuma testēšanai regulatīvā nolūkā ir jāapsver, vai ar to var iegūt paredzētajam regulatīvajam nolūkam pieņemamus rezultātus. Turklāt šajā testā netiek tieši izvērtēta fekunditāte, tāpēc tas ESAO endokrīno disruptoru testēšanas un novērtēšanas konceptuālajā satvarā var nebūt piemērots lietošanai tālākā līmenī par 4.

TESTĒŠANAS METODES ZINĀTNISKAIS PAMATS

7. Mūsu pašreizējā izpratne par abinieku bioloģiju lielā mērā veidojusies, izmantojot laboratorijas paraugsugas *X. laevis* dzīvniekus. Šīs sugas dzīvniekus ir viegli audzēt laboratorijā, to ovulāciju var izraisīt ar cilvēka horija gonadotropīnu (*hCG*), un šo dzīvnieku krājumi ir plaši pieejami no komercaudzētājiem.

8. Abinieku, tāpat kā visu citu mugurkaulnieku, reprodukcija norit hipotalāma, hipofīzes un gonādu (HHG) ass kontrolē (4). Šīs endokrīnās sistēmas mediatori ir estrogēni un androgēni, kas nosaka dzimumdimorfo audu attīstību un fizioloģiju. Abinieku dzīves ciklā ir trīs stadijas, kad šī ass ir sevišķi aktīva: 1) gonādu diferenciācija kāpuru attīstības laikā, 2) sekundāro dzimumpazīmju attīstība un gonādu nobriešana mazuļu stadijā un 3) pieaugušo īpatņu funkcionāla reprodukcija. Ir pamats domāt, ka noteiktas ķimikālijas, piem., estrogēni un androgēni, katrā no šīm attīstības stadijām var izraisīt endokrīnus traucējumus, kuru ietekmē eventuāli mazinās organismu reproduktīvā spēja.

9. Gonādu attīstība sākas 43. NF stadijā, kad attīstās bipotenciālā ģenitālā kore. Gonādu diferenciācija sākas 52. NF stadijā, kad sākotnējās dīgļšūnas vai nu migrē uz medulārajiem audiem (tēviņi), vai paliek attīstošos gonādu kortikālajā reģionā (mātītes) (3). Pirmās ziņas, ka šis gonādu dzimumdiferenciācijas process *Xenopus* ir uzņēmīgs pret ķīmiskām izmaiņām, parādījās XX gs. 50. gados (5) (6). Ja kurkuļi šajā gonādu diferenciācijas periodā tiek eksponēti

▼M8

estradiolam, tēviņi dzimuminvertējas, proti, izaug par pilnīgi funkcionālām mātītēm (7) (8). Ir ziņas arī par mātīšu funkcionālu dzimuminvertēšanos par tēviņiem pēc sēklinieku audu implantācijas kurkuļos (9). Taču, lai gan funkcionālu dzimuminversiju *X. tropicalis* izraisa arī ekspozīcija aromatāzes inhibitoram (10), tas nav konstatēts ar *X. laevis*. Vēsturiski toksikantu ietekme uz gonādu diferenciāciju tika novērtēta, gonādas histoloģiski izmeklējot metamorfozes laikā, un dzimuminversiju varēja noteikt, tikai analizējot dzimumu attiecību. Vēl nesen tieši noteikt *Xenopus* ģenētisko dzimumu nebija iespējams. Tomēr nesen atklāti ar dzimumu saistīti *X. laevis* marķieri, kas dod iespēju noteikt ģenētisko dzimumu un dzimuminvertētos dzīvniekus identificēt tieši (11).

10. Attīstoties jaunajiem tēviņiem, asinīs palielinās testosterona līmenis, kas atbilst sekundāro dzimumpazīmju attīstībai, kā arī sēklinieku attīstībai. Attīstoties mātītēm, olnīcās rodas estradiols, kā ietekmē plazmā parādās vitelogenīns (VTG) un olnīcā — vitelogenīniski oocīti un attīstās olvadi (12). Olvadi ir mātīšu sekundārā dzimumpazīme, kam ir loma oocītu nobriešanā reprodukcijas laikā. Oocītiem virzoties caur olvadu, tie pārklājas ar gļotainu apvalku un, gatavi apaugļošanai, sakrājas ikru maisā. Tā kā olvadu attīstība *X. laevis* (13) un *X. tropicalis* (12) korelē ar estradiola līmeni asinīs, to, šķiet, regulē estrogēni. Ir saņemtas ziņas, ka pēc ekspozīcijas polihlorbifeniliem (14) un 4-*terc*-oktilfenolam (15) olvadi attīstījušies arī tēviņiem.

TESTA PRINCIPS

11. Testa plāns paredz *X. laevis* embrijus, kas ir 8.–10. NF stadijā, ūdens ceļā eksponēt testējamajai ķimikālijai četrās dažādās koncentrācijās, izmantojot arī vienu vai vairākas kontroles, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē, ar vienu starpposma apakšparaugu 62. NF stadijā. Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku ķimikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza. Katrai testējamajai koncentrācijai izmanto četrus replikātus, bet katrai kontrolei astoņus replikātus. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par vispārēju toksicitāti (t. i., mirstība, anormāla uzvedība un pieaugums (garums un masa)), kā arī beigupunktus, kuru mērķis ir raksturot specifiskus endokrīno toksicitāti izraisošus iedarbības veidus, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem fizioloģiskajiem procesiem (t. i., vairogdziedzera histopatoloģija, gonādu un gonādu vadu histopatoloģija, anormāla attīstība, vitelogenīns plazmā (pēc izvēles) un genotipisko/fenotipisko dzimumu attiecības).

TESTA DERĪGUMA KRITĒRIJI

12. Piemērojami šādi testa derīguma kritēriji:

— izšķīdušā skābekļa koncentrācijai visā testa laikā jābūt ≥ 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības;

▼M8

— ūdens temperatūrai jābūt 21 ± 1 °C diapazonā, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 1,0 °C;

— testa šķīduma pH jāuztur no 6,5 līdz 8,5, un atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5;

— jābūt pieejamām liecībām, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām;

— kontrolēs mirstībai katrā replikātā ekspozīcijas periodā vajadzētu būt ≤ 20 %;

— dzīvotspējai nārstojumā, ar kuru izvēlas sākt pētījumu, vajadzētu būt ≥ 70 %;

— medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām;

— kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējai masai 62. NF stadijā un testa beigās vajadzētu sasniegt attiecīgi 1,0 ± 0,2 un 11,5 ± 3 g.

13. Lai gan tas nav derīguma kritērijs, ir ieteicams, lai analīzei būtu pieejamas vismaz trīs līmeņu apstrādes ar trim nekompromitētiem replikātiem. Pārmērīga mirstība, kas apstrādi kompromitē, ir > 4 tādi nāves gadījumi (> 20 %) 2 vai vairāk replikātos, ko nevar izskaidrot ar tehnisku kļūdu. Analīzei vajadzētu būt pieejamām vismaz divu līmeņu apstrādēm bez acīmredzamas toksicitātes. Acīmredzamas toksicitātes pazīmes ir, piemēram (bet ne tikai), pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereaģēšana uz stimuliem, morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiski bojājumi un vēdera uzpūšanās.

14. Ja novērojamas novirzes no testa derīguma kritērijiem, sekas jāaplūko kopsakarā ar testa rezultātu ticamību un šīs novirzes un apsvērumi jāatspoguļo testēšanas pārskatā.

METOŽU APRAKSTS

Aprīkojums

15. Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši:

a) temperatūras regulēšanas aprīkojums (piem., sildītāji vai dzesētāji, kas noregulējami uz 21 ° ± 1 °C);

▼M8

b) termometrs;

c) binokulārs stereomikroskops un disekcijas instrumenti;

d) digitālā kamera ar vismaz 4 megapikseļu izšķirtspēju un mikrorežīmu (ja nepieciešams);

e) analītiskie svari ar precizitāti līdz 0,001 mg vai 1 μg;

f) izšķīdušā skābekļa un pH mērinstrumenti;

g) gaismas intensitātes mērītājs, kas rezultātus uzrāda luksos.

Ūdens

Izcelsme un kvalitāte

16. Atšķaidīšanai var izmantot jebkādu vietēji pieejamu ūdeni (piem., avota ūdeni vai caur ogli izfiltrētu krāna ūdeni), kurā *X. laevis* var normāli augt un attīstīties; vajadzētu būt pierādījumiem, ka dzīvnieki šajā ūdenī aug normāli. Tā kā vietējā ūdens kvalitāte dažādās vietās var būtiski atšķirties, ir jāveic ūdens kvalitātes analīzes, jo īpaši, ja nav pieejami vēsturiski dati par ūdens izmantojamību abinieku kāpuru audzēšanā. Pirms testēšanas sākuma un/vai, piem., reizi sešos mēnešos, ja zināms, ka atšķaidīšanai izmantotā ūdens kvalitāte ir relatīvi nemainīga, jāveic smago metālu (piem., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), biežāk sastopamo anjonu un katjonu (piem., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticīdu, kopējā organiskā oglekļa un suspendēto cietvielu mērījumi. Dažas pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskās īpašības ir norādītas 2. papildinājumā.

Jodīda koncentrācija testēšanas ūdenī

17. Lai vairogdziedzeris varētu sintezēt tiroīdhormonus normālai metamorfozes norisei, kāpuriem ar ūdeni un uzturu jāuzņem pietiekami daudz jodīda. Empīriski iegūtu vadlīniju, kas noteiktu minimālās jodīda koncentrācijas barībā vai uzturā pienācīgai attīstībai, pašlaik nav. Taču jodīda pieejamība var ietekmēt vairogdziedzera sistēmas spēju reaģēt uz vairogdziedzera darbību ietekmējošajām ķimikālijām, un ir zināms, ka tā var mainīt vairogdziedzera pamataktivitāti, tāpēc, interpretējot vairogdziedzera histopatoloģijas rezultātus, šim aspektam jāpievērš uzmanība. Līdzšinējā darbā ir pierādīts, ka tests norit veiksmīgi, ja atšķaidīšanas ūdens jodīda (I⁻) koncentrācija ir diapazonā no 0,5 līdz 10 μg/l. Ideālā gadījumā minimālajai jodīda koncentrācijai atšķaidīšanas ūdenī visā testā jābūt 0,5 μg/l (to pievieno kā nātrija sāli vai kālija sāli). Ja testēšanas ūdeni rekonstituē no dejonizēta ūdens, tam pievieno jodu minimālajā koncentrācijā 0,5 μg/l. Izmērītās jodīda koncentrācijas testa ūdenī (t. i., atšķaidīšanas ūdenī) un testa ūdens papildināšana ar jodu vai citiem sāļiem (ja tāda veikta) jānorāda pārskatā. Joda saturu var mērīt ne tikai testa ūdenī, bet arī barībā.

Ekspozīcijas sistēma

18. Tests ir izstrādāts, izmantojot caurplūdes atšķaidīšanas sistēmu. Sistēmas komponentiem, kas nonāk kontaktā ar ūdeni, jābūt izgatavotiem no stikla, nerūsošā tērauda un/vai citiem ķīmiski inertiem materiāliem. Ekspozīcijas tvertnēm jābūt stikla vai nerūsošā tērauda akvārijiem, un to izmantojamajai ietilpībai jābūt no 4,0 līdz 10,0 l (minimālais ūdens dziļums: 10 līdz 15 cm). Sistēmai jāspēj uzņemt visas ekspozīcijas koncentrācijas, kontroli un vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroli; katrā apstrādē jābūt četriem replikātiem un kontrolēs astoņiem. Plūsmas ātrumam uz katru tvertni jābūt

▼M8

nemainīgam, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķimikālijai. Ieteicams nodrošināt piemērotu caurplūdumu (piem., vismaz 5 tvertnes šķīduma nomaiņas dienā), lai nepieļautu, ka ķimikālijas koncentrācija samazinās tāpēc, ka to metabolizē gan testa organismi, gan akvārijā esošie mikroorganismi, vai tāpēc, ka tā degradējas abiotiski (hidrolīze, fotolīze) vai zūd (izgarošana, sorbcija). Apstrādes tvertnes nejaušināti jāizkārto ekspozīcijas sistēmā tā, lai mazinātu iespējamo novietojuma ietekmi, piem., nelielas temperatūras, gaismas intensitātes u. tml. atšķirības. Papildu informāciju par caurplūdes ekspozīcijas sistēmu iekārtošanu var iegūt *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Ķimikālijas padošana: testa šķīdumu sagatavošana

19. Lai sagatavotu testa šķīdumus ekspozīcijas sistēmā, tajā ar piemērotu sūkni vai citu aparātu dozē testējamās ķimikālijas izejšķīdumu. Pirms ekspozīcijas sākšanas izejšķīduma caurplūdumu kalibrē pēc testa šķīduma analītiskajiem rādītājiem un testa gaitā to periodiski pārbauda volumetriski. Testa šķīdums katrā kamerā jāatjaunina, veicot vismaz 5 tilpumatjaunināšanas dienā.

20. Metodi, ar kādu testējamo ķimikāliju ievadīt sistēmā, nosaka atkarībā no tās fizikālķīmiskajām īpašībām. Tāpēc pirms testa sākšanas par ķimikāliju jāiegūst bāzlīnijas informācija, kas palīdz noteikt tās testējamību. Noderīga informācija par testējamās ķimikālijas specifiskajām īpašībām ir, piemēram, tās struktūrformula, molekulmasa, tīrība, stabilitāte ūdenī un gaismā, pK_a un K_{ow}, šķīdība ūdenī (vēlams, testa vidē) un tvaika spiediens, kā arī bionoārdāmības viegluma testa (testēšanas metode C.4. (17) vai C.29 (18)) rezultāti. Šķīdību un tvaika spiedienu var izmantot, lai aprēķinātu Henrija likuma konstanti, kas norāda, vai var rasties testējamās ķimikālijas zudumi iztvaikošanas dēļ. Testa veikšana bez iepriekš norādītās informācijas uzmanīgi jāizsver, jo pētījuma plāns būs atkarīgs no testējamās ķimikālijas fizikālķīmiskajām īpašībām un testa rezultātus interpretēt bez šiem datiem var būt grūti vai bezjēdzīgi. Vajadzētu būt, ka testējamās ķimikālijas kvantitatīvai noteikšanai testa šķīdumos ir pieejama uzticama analītiska metode ar zināmu un literatūrā minētu pareizību un noteikšanas robežu. Ūdenī šķīstošas testējamās ķimikālijas var izšķīdināt testēšanas ūdens alikvotā tādā koncentrācijā, kas caurplūdes sistēmā ļauj nodrošināt testa mērķkoncentrāciju. Ķimikālijām, kas istabas temperatūrā ir šķidrā vai cietā agregātstāvoklī un ūdenī šķīst vidēji labi, var būt jāizmanto šķidruma:šķidruma vai šķidruma:cietvielas (piem., stikla vates kolonna) saturatori (19). Lai gan var būt iespējams ar barību dot arī ļoti hidrofobisku testējamo ķimikāliju devas, līdz šim šajā testā pieredze ar šo ekspozīcijas ceļu ir maza.

21. Izraudzīto koncentrāciju testa šķīdumus sagatavo, atšķaidot izejšķīdumu. Izejšķīdumu vēlams sagatavot, testējamo ķimikāliju atšķaidīšanas ūdenī vienkārši iemaisot vai tajā iejaucot ar mehāniskiem līdzekļiem (piem., samaisot un/vai apstrādājot ar ultraskaņu). Piemērotas koncentrācijas izejšķīduma iegūšanai var izmantot piesātināšanas kolonnas/sistēmas vai pasīvas dozēšanas metodes (20). Ieteicams izmantot testa sistēmu bez papildšķīdinātāja; tomēr dažādām testējamajām ķimikālijām ir dažādas fizikālķīmiskās īpašības, tāpēc ķimikālijas ekspozīcijas ūdens sagatavošanai parasti vajadzīgas dažādas pieejas. Katrā ziņā jācenšas izvairīties no šķīdinātāju vai nesēju izmantošanas, jo: 1) daži šķīdinātāji paši var izraisīt toksicitāti un/vai nevēlamu vai negaidītu atbildreakciju, 2) ja testējamās ķimikālijas koncentrācija pārsniedz tās šķīdību ūdenī (kā nereti gadās, ja izmanto šķīdinātājus), noteiktās efektīvās koncentrācijas var būt nepareizas, 3) šķīdinātāju izmantošana ilgākos testos var radīt ievērojamu bioplēvi, kas saistāma ar mikroorganismu

▼M8

aktivitāti, un tā var ietekmēt vides apstākļus, kā arī spēju uzturēt ekspozīcijas koncentrācijas un, 4) ja nav vēsturisko datu, kas pierāda, ka šķīdinātājs pētījuma iznākumu neietekmē, šķīdinātājus var izmantot tikai ar šķīdinātāja kontroli, savukārt tas ir pretrunā dzīvnieku labklājības principiem, jo testa veikšanai tad vajadzīgi papildu dzīvnieki. Šķīdinātāju izmanto kā galēju līdzekli sarežģīti testējamu ķimikāliju gadījumā, un piemērotāko metodi izvēlas, izmantojot ESAO norādījumu dokumentu par sarežģīti testējamu vielu un maisījumu ūdenstoksiskuma testēšanu (21). Šķīdinātāja izvēli nosaka testējamās ķimikālijas ķīmiskās īpašības un pieejamie vēsturiskie kontroļu dati par šķīdinātāja izmantošanu. Ja vēsturisko datu nav, pirms galīgā pētījuma veikšanas jānosaka šķīdinātāja piemērotība. Ja no šķīdinātāja izmantošanas nevar izvairīties un novērojama mikrobiāla aktivitāte (bioplēves veidošanās), ieteicams visā testa laikā reģistrēt / pārskatā norādīt bioplēves apmēru katrā tvertnē (vismaz reizi nedēļā). Ideālā gadījumā šķīdinātāja koncentrācija šķīdinātāja kontrolē un visās apstrādātajās grupās būtu jāuztur nemainīga. Ja šķīdinātāja koncentrāciju neuztur nemainīgu, šķīdinātāja kontrolē jāizmanto augstākā šķīdinātāja koncentrācija, ko izmanto apstrādē. Gadījumos, kad par nesēju izmanto šķīdinātāju, maksimālajai šķīdinātāja koncentrācijai nevajadzētu pārsniegt 100 µl/l vai 100 mg/l (21) un ir ieteicams šķīdinātāja koncentrāciju saglabāt pēc iespējas zemu (piem., ≤ 20 µl/l), lai novērstu iespējamu šķīdinātāja ietekmi uz mērītajiem beigupunktiem (22).

Testa dzīvnieki

Testa suga

22. Testa suga ir *X. laevis* šādu iemeslu dēļ: 1) to bieži audzē laboratorijās visā pasaulē, 2) to ir viegli iegūt no komerciāliem piegādātājiem un 3) tai var noteikt ģenētisko dzimumu.

Pieaugušo dzīvnieku kopšana un audzēšana

23. Piemērota *X. laevis* kopšana un audzēšana ir aprakstīta standartizētā vadlīnijā (23). *X. laevis* turēšana un kopšana aprakstīta arī *Read* (24). Lai inducētu vairošanos, trim līdz pieciem pieaugušu mātīšu un tēviņu pāriem intraperitoneāli injicē cilvēka horija gonadotropīnu (*hCG*). Mātītēm un tēviņiem injicē, piem., attiecīgi aptuveni 800–1 000 SV [starptautiskās vienības] un 500–800 SV *hCG*, kas izšķīdināts 0,6–0,9 % fizioloģiskā šķīduma (vai varžu Ringera šķīduma, kas ir izotonisks fizioloģiskais šķīdums abiniekiem). Injicē aptuveni 10 µl uz g ķermeņa masas (~ 1 000 µl). Pēc inducēšanas vaislas pārus netraucētus tur lielās tvertnēs, kurās ir statiski apstākļi, lai veicinātu ampleksu. Vairošanās tvertnēm jābūt ar nerūsošā tērauda sieta dubultdibenu (piem., ar 1,25 cm acīm), kas ikriem ļauj uzkrāties tvertnes apakšā. Vardes, kas *hCG* injekciju saņēmušas vēlā pēcpusdienā, lielāko daļu ikru parasti

▼M8

iznērš nākamās dienas priekšpusdienā. Kad iznērsts un apaugļots pietiekams daudzums ikru, pieaugušos dzīvniekus no vairošanās tvertnēm izņem. Tad ikrus savāc un atgļoto ar L-cisteīnu (23). Sagatavo 2 % L-cisteīna šķīdumu, kura pH koriģē līdz 8,1 ar 1 M NaOH. Šo 21 °C silto šķīdumu ielej 500 ml Erlenmeijera kolbā, kurā ir viena nārsta ikri, un minūti vai divas uzmanīgi skalo uz riņķi, bet pēc tam 6–8 reizes rūpīgi noskalo ar 21 °C siltu kultūršķīdumu. Tad ikrus pārnes uz kristalizācijas trauku un nosaka to dzīvotspēju, kam jābūt > 70 %, un embrijos, kuros konstatējama šūnu dalīšanās, anormālijām jābūt minimālām.

TESTA PLĀNS

Testējamās koncentrācijas

24. Ir ieteicams izmantot vismaz četras ķimikālijas koncentrācijas un attiecīgas kontroles (vajadzības gadījumā arī šķīdinātāja kontroles). Parasti ieteicams izmantot koncentrāciju intervālu (atstatumu koeficientu), kas nepārsniedz 3,2.

25. Lai izvairītos no acīmredzami toksiskām koncentrācijām, testa vajadzībām augstākās testējamās koncentrācijas noteikšanai pēc iespējas lielā mērā izmanto līdzšinējo abinieku pētījumu rezultātus. Šo koncentrāciju noteikt var palīdzēt informācija par struktūras un aktivitātes kvantitatīvajām sakarībām, informācija par analogiem un dati no līdzšinējiem abinieku pētījumiem, piem., abinieku metamorfozes testa (testēšanas metode C.38 (25)) un *Xenopus* varžu embriju teratoģenēzes testa (23) un/vai testiem ar zivīm, piem., testēšanas metodēm C.48, C.41 un C.49 (26) (27) (28). Pirms *LAGDA* var veikt diapazona noteikšanas eksperimentu. Ir ieteicams diapazona noteikšanas nolūkos veicamo ekspozīciju sākt 24 stundu laikā pēc apaugļošanas un turpināt 7–14 dienas (vai vairāk, ja nepieciešams), un testējamās koncentrācijas noteikt tādas, ka intervāli starp tām nepārsniedz koeficientu 10. Diapazona noteikšanas eksperimenta rezultāti būtu jāizmanto augstākās *LAGDA* testējamās koncentrācijas noteikšanai. Jāatzīmē, ka, ja nākas izmantot šķīdinātāju, diapazona noteikšanas pētījuma ietvaros var noskaidrot arī šķīdinātāja piemērotību (t. i., vai tas ietekmē pētījuma iznākumu).

Apstrādes grupu un kontroļu replikāti

26. Jāizmanto vismaz četras replikāttvertnes uz testa koncentrāciju un vismaz astoņi replikāti uz kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda vajadzīga), proti, lai panāktu pienācīgu statistisko jaudu, replikātu skaitam kontrolē un šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir, jābūt divreiz lielākam par replikātu skaitu katrā apstrādes grupā. Katrā replikātā jābūt ne vairāk kā 20 dzīvniekiem. Minimālais dzīvnieku skaits būtu 15 (562. NF stadijas apakšparaugam un 10 mazuļi). Tomēr, lai ņemtu vērā mirstību un panāktu, ka dzīvnieku skaits nenoslīd zem kritiskā skaita 15, katram replikātam pievieno papildu dzīvniekus.

PROCEDŪRA

Testa pārskats

27. Testu sāk ar tikko iznērstiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina līdz mazuļu attīstībai. Dzīvniekus ik dienas apskata, lai konstatētu nāves gadījumus un anormālas uzvedības pazīmes. 62. NF stadijā savāc kāpuru apakšparaugu (līdz 5 dzīvniekiem uz replikātu) un noskaidro vairākus beigupunktus (1. tabula). Kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju, proti,

▼M8

noslēgusies metamorfoze (vai aptuveni 70 dienas pēc testa sākšanas — atkarībā no tā, kura diena ir agrāka), veic nejaušinātu atlasi (bez apakšparaugošanas), lai dzīvnieku skaitu samazinātu (10 uz tvertni) (sk. 43. punktu), bet atlikušos dzīvniekus turpina eksponēt, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē. Testu beidzot (mazuļu paraugošana), veic papildu mērījumus (1. tabula).

Ekspozīcijas nosacījumi

28. Pilnīgs testa parametru kopsavilkums atrodams 3. papildinājumā. Ekspozīcijas periodā ik dienas mēra testa šķīdumos izšķīdušo skābekli, temperatūru un pH. Elektrovadītspēju, sārmainību un cietību mēra reizi mēnesī. Testa šķīdumu ūdens temperatūra dažādos replikātos un dažādās apstrādēs (vienas dienas ietvaros) nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 1,0 °C. Savukārt testa šķīdumu pH dažādos replikātos un dažādās apstrādēs nedrīkstētu atšķirties par vairāk nekā 0,5.

29. Ekspozīcijas tvertnes ik dienas var iztīrīt ar sifonu, lai noņemtu neapēsto barību un ekskrementus, izvairoties no tvertņu krusteniskas kontaminācijas. Jāuzmanās dzīvniekiem neradīt stresu un tos netraumēt, it sevišķi pārvietošanas, akvārija tīrīšanas un manipulāciju laikā. Jāizvairās no stresu izraisošiem apstākļiem/darbībām, piem., skaļa un/vai nerimtīga trokšņa, klauvēšanas pa akvārijiem, tvertņu vibrācijām.

Ekspozīcijas ilgums

30. Ekspozīciju testējamajai ķimikālijai sāk ar jauniznērstiem embrijiem (8.–10. NF stadija) un turpina, līdz pagājušas desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai kontrolē (≤ 45 dienas pēc testa sākšanas). Parasti *LAGDA* ilgst 16 nedēļas (ne vairāk kā 17 nedēļas).

Testa sākšana

31. Testa sākšanai ņem tādus vecākdzīvniekus, par kuriem iepriekš pierādīts, ka to pēcnācējiem var noteikt ģenētisko dzimumu (5. papildinājums). Pēc pieaugušo dzīvnieku nārsta embrijus savāc, atgļoto ar cisteīnu un atlasa pēc dzīvotspējas (23). Ar cisteīnu apstrādātie embriji atlases laikā nelīp pie virsmām. Atlasi veic ar stereomikroskopu, izmantojot piemērota lieluma pipeti nedzīvo embriju izņemšanai. Ir vēlams testam izmantot viena nārsta ikrus, kuru dzīvotspēja pārsniedz 70 %. 8.–10. NF stadijas embrijus nejaušināti sadala ekspozīcijai pakļautajās apstrādes tvertnēs, kurās ir pietiekams atšķaidīšanas ūdens tilpumdaudzums, līdz katrā tvertnē ir 20 embriji. Pārvietošanas laikā ar embrijiem jāapietas uzmanīgi, lai mazinātu manipulāciju izraisīto stresu un izvairītos no ievainojumiem. 96 h pēc apaugļošanas kurkuļiem vajadzētu būt pārvietojušamies ūdens slānī uz augšu un piestiprinājušamies tvertnes sienām.

Barošanas režīms

32. Ļoti svarīgs *LAGDA* protokola aspekts ir barības un barošanas režīma izmaiņas dažādās *X. laevis* dzīves cikla stadijās. Pārbarošana kāpuru fāzē parasti palielina skoliozes incidenci un smagumu (8. papildinājums), tāpēc no tās būtu jāizvairās. Savukārt nepietiekama barošana kāpuru fāzē noved pie ļoti atšķirīgiem attīstības rādītājiem kontrolēs, kas potenciāli var kompromitēt statistisko jaudu vai novest pie maldīgiem testa rezultātiem. Caurplūdes

▼M8

apstākļiem ieteicamā *X. laevis* kāpuru un mazuļu diēta un barošanas režīms ir aprakstīti 4. papildinājumā, bet var izmantot arī alternatīvu pieeju, ja vien testa organismi aug un attīstās apmierinoši. Jāatzīmē, ka, ja tiek mērīti endokrīnajai sistēmai specifiski beigupunkti, barība nedrīkst saturēt endokrīni aktīvas vielas, piemēram, sojas miltus.

Kāpuru barošana

33. Kāpurus ieteicams barot ar foreļu starterbarību, spirulīnas aļģu diskiem un zelta zivtiņām domātām pārslām (piem., *TetraFin*® pārslām, *Tetra*, Vācija), kas sajauktas kultūras (vai atšķaidīšanas) ūdenī. Maisījumu dod trīs reizes dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. No 8. dienas pēc apaugļošanas kurkuļus baro arī ar dzīviem 24 h veciem sāļūdens garneļu (*Artemia* spp.) nauplijiem — divreiz dienā darbdienās un reizi dienā nedēļas nogalēs. Kāpuru barošanai, kam katrā testa tvertnē jānorit vienādi, testa dzīvniekiem jāļauj pienācīgi augt un attīstīties, lai nodrošinātu testa rezultātu reproducējamību un pārnesamību: 1) medianālajam laikam līdz 62. NF stadijai kontrolēs vajadzētu būt ≤ 45 dienām un 2) ieteicams, lai vidējā masa kontrolēs 62. NF stadijā būtu 1,0 ± 0,2 g.

Mazuļu barošana

34. Kad metamorfoze ir beigusies, dzīvniekus baro ar pirmšķirīgu grimstošu varžu barību, piem., *Sinking Frog Food -3/32* (*Xenopus Express*, FL, ASV) (4. papildinājums). Vardulēnu (agrīno stadiju mazuļu) gadījumā granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās vai blenderī vai saberž piestā. Kad mazuļi ir pietiekami lieli, lai varētu granulas ēst veselas, tās samalt vai saberzt vairs nav nepieciešams. Dzīvniekus baro reizi dienā. Mazuļi jābaro tā, lai tie varētu pienācīgi augt un attīstīties: kontrolēs mazuļu vidējai masai testa beigās ieteicams būt 11,5 ± 3 g.

Analītiskā ķīmija

35. Pirms testa sākšanas (piemēram, izmantojot pieejamo informāciju un zināšanas) jānoskaidro testējamās ķimikālijas stabilitāte (piem., šķīdība, noārdāmība un gaistamība) un visas vajadzīgās analītiskās metodes. Ja devu dod ar atšķaidīšanas ūdeni, ir ieteicams pirms testa sākšanas katras replikāttvertnes testa šķīdumu izanalizēt, lai pārliecinātos par sistēmas veiktspēju. Ekspozīcijas periodā pienācīgos intervālos nosaka testējamās ķimikālijas koncentrācijas, vēlams — reizi nedēļā vismaz vienā katras apstrādes grupas replikātā, katru nedēļu izvēloties citu tās pašas apstrādes grupas replikātu. Rezultātus ieteicams balstīt uz izmērītajām koncentrācijām. Tomēr, ja testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā visā testa laikā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap nominālo koncentrāciju, rezultātu var balstīt kā uz izmērītajām, tā nominālajām vērtībām. Turklāt izmērīto testējamo koncentrāciju variācijas koeficientam (VK) visā testa periodā katrā apstrādē un katrā koncentrācijā vajadzētu pastāvīgi būt 20 % vai mazākam. Ja izmērītās koncentrācijas neturas diapazonā no 80 līdz 120 % no nominālās koncentrācijas (piem., testējot ļoti bionoārdāmas vai adsorbtīvas ķimikālijas), efektīvās koncentrācijas caurplūdes testiem būtu jānosaka un jāizsaka attiecībā pret aritmētisko vidējo koncentrāciju.

▼M8

36. Atšķaidīšanas ūdens un izejšķīduma caurplūdums visu ekspozīcijas laiku būtu piemērotos intervālos jāpārbauda (piem., trīs reizes nedēļā). Ja ķimikāliju kādā nominālajā koncentrācijā vai tajās visās nevar detektēt (piem., tāpēc, ka tā testa traukos ātri noārdās vai adsorbējas vai ievērojami uzkrājas eksponēto dzīvnieku organismā), ir ieteicams testa šķīduma atjaunināšanas rādītāju katrā kamerā koriģēt tā, lai testa koncentrācija būtu pēc iespējas nemainīga.

Novērojumi un beigupunktu mērījumi

37. Ekspozīcijas laikā izvērtē beigupunktus, kas liecina par toksicitāti (tostarp mirstība, anormāla uzvedība, piem., klīniskas slimības un/vai vispārējas toksicitātes pazīmes) un raksturo pieaugumu (garums un masa), kā arī patoloģiskos beigupunktus, kuri var reaģēt gan uz vispārējo toksicitāti, gan endokrīnajiem iedarbības veidiem, kas vērsti uz estrogēna, androgēna vai vairogdziedzera hormonu mediētiem ceļiem. Turklāt testa beigās pēc izvēles var izmērīt VTG koncentrāciju plazmā. VTG mērījumi var palīdzēt saprast pētījuma rezultātus domājamu EDĶ endokrīno iedarbības mehānismu kontekstā. Kopsavilkums par beigupunktiem un mērījumu grafiku ir sniegts 1. tabulā.

1. tabula

Pārskats par *LAGDA* beigupunktiem

Beigupunkti (*)	Ik dienu	Starpposma paraugošana (kāpuru paraugošana)	Testa beigas (mazuļu paraugošana)
Mirstība un anormālijas	X		
Laiks līdz 62. NF stadijai		X	
Histo(pato)loģija (vairogdziedzeris)		X	
Morfometrija (masas un garuma pieaugums)		X	X
Hepatosomatiskais indekss (HSI)			X
Ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības			X
Histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, nieres un aknas)			X
Vitelogenīns (VTG) (pēc izvēles)			X

(*) Visus beigupunktus analizē statistiski.

Mirstība un dienišķie novērojumi

38. Katru dienu pārbauda, vai testa tvertnēs nav mirušu dzīvnieku un katrā tvertnē konstatētos nāves gadījumus reģistrē. Mirušie dzīvnieki iespējami ātri no testa tvertnes jāizņem. Jānosaka mirušo dzīvnieku attīstības stadija — posms līdz 58. NF stadijai (pirms priekšējo ekstremitāšu parādīšanās), 58.–62. NF stadija, 63.–66. NF stadija (no 62. NF stadijas līdz pilnīgai astes absorbcijai) vai posms pēc 66. NF stadijas (pēckāpuru posms). Ja

▼M8

mirstība pārsniedz 20 %, tas var liecināt par nepienācīgiem testēšanas apstākļiem vai acīmredzami toksisku testējamās ķimikālijas ietekmi. Īpaši jutīgi pret neķīmiskiem nāves cēloņiem dzīvnieki mēdz būt pirmajās attīstības dienās pēc nārsta un metamorfozes klimaksa laikā. Šādai mirstībai vajadzētu būt novērojamai arī kontrolēs.

39. Jebkāda novērota anormāla uzvedība, acīmredzamas malformācijas (piem., skolioze) vai bojājumi jāreģistrē. Novērotie skoliozes gadījumi jāuzskaita (incidence) un jāizvērtē to smagums (piem., neizteikta — N, minimāla — 1, vidēja — 2, smaga — 3; 8. papildinājums). Jācenšas panākt, lai vidēja un smaga skolioze visā pētījuma laikā būtu maz izplatīta (piem., mazāk nekā 10 % kontrolēs), lai gan arī lielāka anormāliju prevalence kontrolēs ne vienmēr ir iemesls testu izbeigt. Normālai uzvedībai raksturīgi, ka ūdenī esošajiem kāpuriem aste atrodas augstāk par galvu, ir regulāras un ritmiskas astes spuras kustības, tie periodiski uznirst, tiem kustas operkulas, tie reaģē uz stimuliem. Par anormālu uzvedību liecina, piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana un nereaģēšana uz stimuliem. Attiecībā uz postmetamorfiskiem dzīvniekiem līdzās norādītajai anormālajai uzvedībai jāreģistrē arī ievērojamas barības uzņēmšanas atšķirības dažādās apstrādēs. Smagas malformācijas un bojājumi var ietvert morfoloģiskas anormālijas (piem., deformētas ekstremitātes), hemorāģiskus bojājumus, vēdera uzpūšanos un bakteriālu infekciju vai sēnīšinfekciju. Mazuļu galvas bojājumi tieši aiz nāsīm var liecināt par nepietiekamu mitrumu. Šie konstatējumi ir kvalitatīvi, un tie būtu jāuztver kā klīniskas slimības/stresa pazīmes un jāskata salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem. Ja šo pazīmju biežums eksponētajās tvertnēs ir lielāks nekā kontrolēs, pieņem, ka tās liecina par acīmredzamu toksicitāti.

Kāpuru apakšparaugošana

Kāpuru apakšparaugošanas kopapskats

40. Kurkuļus, kas sasnieguši 62. NF stadiju, vai nu no tvertnēm izņem un iekļauj paraugā vai pārvieto uz nākamo ekspozīcijas fāzi jaunā tvertnē, vai arī fiziski nošķir no pārējiem tās pašas tvertnes kurkuļiem ar atdalītāju. Kurkuļus ik dienas pārbauda, un reģistrē, kurā pētījuma dienā katrs kurkulis sasniedz 62. NF stadiju. Šajā novērtējumā izmantojamā pazīme ir galvas forma. Kad galva ir samazinājusies tiktāl, ka vizuāli izskatās tikpat plata kā kurkuļa torss, un priekšējās ekstremitātes ir sirds vidus līmenī, uzskata, ka īpatnis ir sasniedzis 62. NF stadiju.

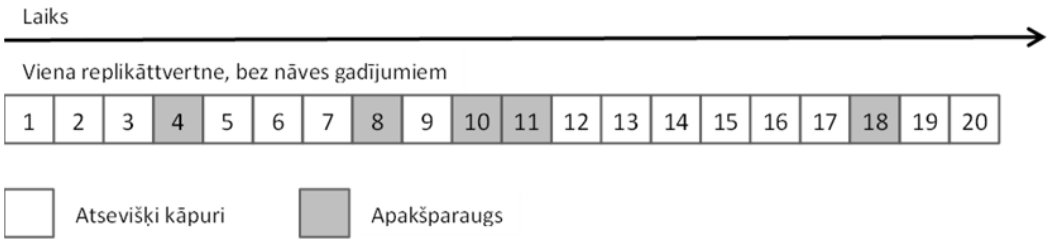
41. Mērķis ir uz katru replikāttvertni paraugot kopā piecus 62. NF stadijas kurkuļus. Tas būtu jādara pilnīgi nejaušināti, bet jāizlemj jau iepriekš. Hipotētisks replikāttvertnes paraugs redzams **1. attēlā**. Ja tad, kad pirmais īpatnis sasniedz 62. NF stadiju, konkrētā tvertnē ir 20 dzīvi kurkuļi, pēc nejaušības principa izvēlas piecus skaitļus no 1 līdz 20. Pirmais īpatnis, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #1, bet pēdējais, kas sasniedz 62. NF stadiju, ir kurkulis #20. Savukārt tad, ja tvertnē ir 18 dzīvi kurkuļi, piecus nejaušos skaitļus izvēlas no 1 līdz 18. Tā rīkojas ar katru replikāttvertni, kad pirmais īpatnis tajā sasniedz 62. NF stadiju. Ja NF 62. stadijas paraugojumā ir nāves gadījumi, atlikušos paraugus nejaušina vēlreiz atkarībā no tā, cik kāpuru palicis par 62. NF stadiju agrākās stadijās, un cik paraugi vēl vajadzīgi, lai būtu pieci paraugi no replikāta. Dienā, kad kurkulis sasniedz 62. NF stadiju, pēc sagatavotā paraugošanas grafika nosaka, vai kurkuli paraugo vai fiziski

▼**M8**

nošķir no pārējiem, lai turpinātu tā eksponēšanu. Sniegtajā piemērā (1. attēls) pirmo īpatni, kas sasniedz 62. NF stadiju (t. i., 1. lodziņš) fiziski nošķir no pārējiem kāpuriem, turpina tā eksponēšanu un atzīmē, kurā pētījuma dienā tas sasniedzis 62. NF stadiju. Pēc tam tāpat rīkojas ar 2. un 3. īpatni, savukārt 4. īpatni paraugo, nosakot tā pieaugumu un vairogdziedzera histoloģiju (pēc šā parauga). Procedūru turpina tik ilgi, līdz 20. īpatnis vai nu pievienojas pārējiem īpatņiem, kas sasnieguši 62. NF stadiju, vai tiek paraugots. Nejaušajai atlasei jānodrošina, ka visiem testa dzīvniekiem ir vienāda varbūtība tikt izraudzītiem. To var panākt ar jebkādu nejaušināšanas metodi, bet kādā 62. NF stadijas apakšparaugošanas perioda posmā jātiek notvertam katram kurkulim.

1. attēls

Hipotētisks piemērs: 62. NF stadijas paraugošanas režīms vienā replikāttvertnē



42. Kāpuru apakšparaugošanā noskaidro šādus beigupunktus: 1) laiks līdz 62. NF stadijai (t. i., no apaugļošanas līdz 62. NF stadijai apritējušo dienu skaits), 2) ārējas anormālijas, 3) morfometrija (piem., masa un garums) un 4) vairogdziedzera histoloģija.

Humāna kurkuļu nonāvēšana

43. 62. NF stadijas kurkuļu apakšparaugu (5 īpatņi uz replikātu) eitanazē, tos uz 30 min iegremdējot pietiekamā daudzumā (piem., 500 ml) anestētiska šķīduma (piem., MS-222, trikaīna metānsulfonāta, *CAS* Nr. 886-86-2, 0,3 % šķīdums). MS-222 šķīdums būtu ar nātrija bikarbonātu jābuferē, līdz tā pH sasniedz aptuveni 7,0, jo nebuferēts MS-222 šķīdums ir skābs un kairina varžu ādu, tāpēc vāji absorbējas un dzīvniekiem rada nevajadzīgu papildu stresu.

44. Izmantojot tīkliņu, kurkuli izņem no eksperimenta kameras un ievieto eitanāzijas šķīdumā. Dzīvnieks ir pienācīgi eitanazēts un gatavs nekropsijai, kad tas nereaģē uz ārējiem kairinājumiem, piem., pakaļējo ekstremitāšu saspiešanu ar pinceti.

Morfometrija (masa un garums)

45. Tūlīt pēc tam, kad kurkulis anestēzijas ietekmē beidz reaģēt uz kairinājumiem, izmēra tā slapjmasu (līdz tuvākajam mg) un garumu no purna līdz kloākai (līdz tuvākajam 0,1 mm) (sk. 2.a attēlu). Izmantojot attēlu analīzes programmatūru, garumu no purna līdz kloākai var izmērīt no fotogrāfijas. Pirms svēršanas kurkuļi jānosusina, lai noņemtu lieko ūdeni. Pēc ķermeņa

▼M8

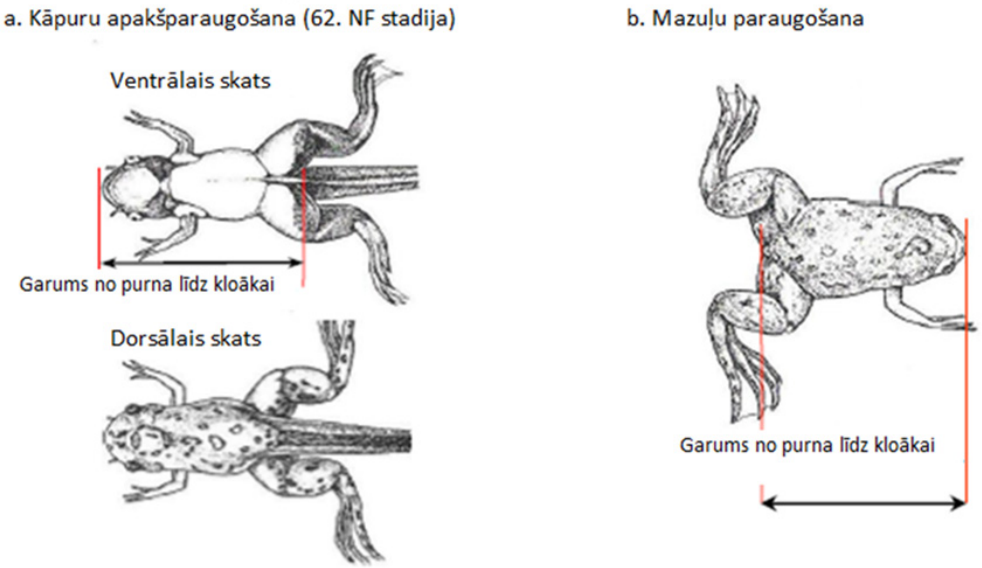
lieluma (masas un garuma no purna līdz kloākai) mērījumiem reģistrē vai piefiksē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas un/vai klīniskas toksicitātes pazīmes, piem., skoliozi (sk. 8. papildinājumu), petehijas un asinsizplūdumus, un ieteicams šos datus dokumentēt digitāli. Petehijas ir nelieli sarkani vai violeti asinsizplūdumi ādas kapilāros.

Audu ievākšana un fiksācija

46. Novērtē kāpuru apakšparauga vairogdziedzeru histoloģiju. Torsa apakšdaļu aiz priekšējām ekstremitātēm noņem un izmet. Apgriezto ķermeni fiksē ar Deividsona fiksatoru. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Lai interesējošos audus pienācīgi fiksētu, fiksators jāmaisa vai jāskalina riņķveidā. Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Vairogdziedzera histoloģija

47. Katram kāpuru apakšparaugam (fiksētajiem audiem) histoloģiski novērtē vairogdziedzeri, t. i., nosaka diagnozi un bojājumu smagumu (29) (30).



2. attēls. Atskaites punkti, pēc kuriem testā *LAGDA* mēra 62. NF stadijas īpatņu (a) un varžu mazuļu (b) garumu no purna līdz kloākai. 62. NF stadijas īpatņu (a) pazīmes: galva tikpat plata kā torss, ožas nervs īsāks par ožas sīpola diametru (dorsālais skats) un priekšējās ekstremitātes sirds līmenī (ventrālais skats). Attēli adaptēti no *Nieuwkoop and Faber* (1994).

Kāpuru ekspozīcijas beigas

48. Ņemot vērā kurkuļu sākotnējo skaitu, gaidāms, ka neliela procentuālā to daļa neattīstīsies normāli un to metamorfoze pilnīgi nenoslēgsies (66. NF stadija) saprātīgā laikā. Kāpuru ekspozīcijai nevajadzētu pārsniegt 70 dienas.

▼M8

Kurkuļus, kuru metamorfoze līdz šā perioda beigām nav beigusies, eitanazē (sk. 43. punktu), izmēra to slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai, nosaka to stadiju pēc *Nieuwkoop and Faber* (1994) un atzīmē jebkādas konstatētas ontoģenētiskas anormālijas.

Atlase pēc 66. NF stadijas

49. Pēc 66. NF stadijas (pilnīga astes resorbcija) katrā tvertnē līdz ekspozīcijas beigām vajadzētu palikt desmit īpatņiem. Tāpēc, kad visi dzīvnieki sasnieguši 66. NF stadiju vai apritējušas 70 dienas (atkarībā no tā, kas notiek ātrāk), veic atlasi. Pēc 66. NF stadijas sasniegšanas nejaušināti izvēlas, kuru dzīvnieku ekspozīciju neturpināt.

50. Dzīvniekus, kuri nav atlasīti ekspozīcijas turpināšanai, eitanazē (sk. 43. punktu). Katram dzīvniekam nosaka ontoģenētisko stadiju, slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai (2.b attēls), kā arī veic makroskopisku nekropsiju. Atzīmē fenotipisko dzimumu (balstoties uz gonādu morfoloģiju): mātīte, tēviņš vai nav nosakāms.

Mazuļu paraugošana

Pārskats par mazuļu paraugošanu

51. Atlikušo dzīvnieku eksponēšanu turpina, līdz pagājušas 10 nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai atšķaidīšanas ūdens kontrolē (un/vai šķīdinātāja kontrolē, ja tāda ir). Ekspozīcijas perioda beigās atlikušos dzīvniekus (ne vairāk kā 10 vardes uz replikātu) eitanazē un izmēra vai izvērtē un reģistrē dažādos beigupunktus: 1) morfometrija (masa un garums), 2) fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecības 3) aknu masa (hepatosomatiskais indekss), 4) histopatoloģija (gonādas, reproduktīvie kanāli, aknas un nieres) un (pēc izvēles) 5) VTG plazmā.

Humāna varžu nonāvēšana

52. Paraugotos mazuļus, postmetamorfiskās vardes, eitanazē, tām intraperitoneāli injicējot anestēzijas līdzekli, piem., 10 % MS-222 piemērotā fosfātbuferētā šķīdumā. Vardes var paraugot, kad tās vairs nereaģē uz kairinājumu (parasti aptuveni 2 min pēc injekcijas, ja 10 % MS-222 izmanto devā 0,01 ml uz vardes masas g). Lai gan varžu mazuļus varētu iegremdēt augstākas koncentrācijas anestēzijas līdzeklī (MS-222), pieredze rāda, ka ar tādu metodi anestēzija notiek vēlāk un ilgums var nebūt piemērots paraugošanai. Injekcija nodrošina efektīvu, ātru eitanāziju pirms paraugošanas. Paraugošanu nevajadzētu sākt, kamēr nav pārbaudīts, ka vardes nereaģē uz kairinājumu, tā pārliecinoties, ka dzīvnieki ir nedzīvi. Ja vardēm novērojamas ievērojamu ciešanu pazīmes (ļoti smagas, droši paredzama nāve) un tās uzskatāmas par mirstošām, tās anestezē un eitanazē, bet datu analīzes nolūkos uzskata par nāves gadījumiem. Ja vardi eitanazē tāpēc, ka tā mirst, tas jāatzīmē un jānorāda pārskatā. Atkarībā no tā, kurā pētījuma brīdī vardi eitanazē, var vardi paturēt, lai tai veiktu histopatoloģisko analīzi (vardi fiksēt iespējamas histopatoloģijas vajadzībām).

Morfometrija (masa un garums)

53. Slapjmasu un garumu no purna līdz kloākai (2.b attēls) mēra tāpat kā kāpuru apakšparaugojuma gadījumā.

▼**M8**

VTG plazmā (pēc izvēles)

54. VTG ir plaši atzīts biomarķieris, kas liecina par ekspozīciju estrogēniskām ķimikālijām. Testā *LAGDA* pēc izvēles var mērīt paraugoto mazuļu VTG līmeni plazmā (tas var būt īpaši relevanti, ja ir aizdomas, ka testējamā ķimikālija ir estrogēns).

55. Eitanazēto mazuļu pakaļējās ekstremitātes nogriež un asinis savāc pa heparinizētu kapilāru (lai gan piemērotas var būt arī citas asins savākšanas metodes, piem., sirds punkcija). Asinis izlaiž mikrocentrifūgas stobriņā (piem., ar tilpumu 1,5 ml) un centrifugē, lai iegūtu plazmu. Plazmas paraugus līdz VTG noteikšanai glabā -70 °C vai zemākā temperatūrā. VTG koncentrāciju plazmā var izmērīt ar imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*) (6. papildinājums) vai kādu citu metodi, piem., masspektrometriju (31). Lielāka jutīguma dēļ priekšroka dodama sugai specifiskām antivielām.

Ģenētiskā dzimuma noteikšana

56. Katram varžu mazulim nosaka ģenētisko dzimumu, balstoties uz *Yoshimoto et al.* (11) izstrādātajiem marķieriem. Lai noteiktu ģenētisko dzimumu, disekcijas laikā ņem vienas pakaļējās ekstremitātes daļu (vai to visu, vai jebkādus citus audus) un to ievieto mikrocentrifūgas stobriņā (varžu audu paraugus var ņemt no jebkādiem audiem). Līdz dezoksiribonukleīnskābes (DNS) izolēšanai audus var glabāt -20 °C vai zemākā temperatūrā. DNS izolēšanu no audiem var veikt ar komerciāli pieejamiem piederumu komplektiem, un analīzi uz marķiera esību vai neesību veic ar polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) metodi (5. papildinājums). Parasti kontrolgrupu dzīvnieku histoloģiskais dzimums un genotips mazuļu paraugošanas laikā sakrīt par vairāk nekā 95 %.

Audu ņemšana un fiksēšana histopatoloģijas vajadzībām

57. Histoloģiskajai analīzei galīgās paraugošanas laikā ņem gonādas, reproduktīvos kanālus, nieres un aknas. Atver vēdera dobumu, disektējot izņem aknas un tās nosver. Tad no vēdera apakšdaļas izņem gremošanas orgānus (piem., kuņģi, zarnas), atklājot gonādas, nieres un reproduktīvos kanālus. Jāatzīmē jebkādas smagas morfoloģiskas anormālijas gonādās. Beigās noņem pakaļējās ekstremitātes, ja tās nav jau iepriekš noņemtas asiņu savākšanai. Izņemtās aknas un ķermeni ar gonādām vēl *in situ* nekavējoties ievieto Deividsona fiksatorā. Tvertnē vajadzētu būt vismaz 10 reizes vairāk fiksatora nekā audu (aptuveni, pēc tilpuma). Visus audus Deividsona fiksatorā tur vismaz 48 h, bet ne ilgāk kā 96 h; tad tos noskalo ar dejonizētu ūdeni un glabā 10 % neitrālā buferētā formalīnā (1) (29).

Histopatoloģija

58. Katru paraugoto mazuli histoloģiski izvērtē uz gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu audu patoloģijām, t. i., nosaka diagnozi un piešķir smaguma atzīmi (32). No šā izvērtējuma iegūst arī gonādu fenotipu (piem., olnīcas, sēklinieki, hermafrodītisms), un kopā ar īpatņa ģenētiskā dzimuma raksturojumu šos novērojumus var izmantot fenotipisko/genotipisko dzimumu attiecību aprēķināšanai.

▼M8

DATI UN PĀRSKATA SAGATAVOŠANA

Statistiskā analīze

59. Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati (masa, garums no purna līdz kloākai, HSI, VTG), 2) "laiks līdz notikumam" tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (t. i., dienas līdz 62. NF stadijai no testa sākšanas) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontoģenētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem.

60. Ir ieteicams, lai testa plāns un statistisko testu atlase dotu pietiekamu jaudu noteikt bioloģiski svarīgas izmaiņas beigupunktos gadījumos, kad jāziņo *NOEC* vai ECx. Veicot datu statistisko analīzi (parasti — balstoties uz replikātu vidējām vērtībām), vēlams ievērot procedūras, kas aprakstītas dokumentā *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* ["Ekotoksiskuma datu statistiskās analīzes pašreizējās metodes: lietošanas norādījumi"] (33). Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi, un norādījumi, kā datus apstrādāt un kā izvēlēties testam *LAGDA* vispiemērotāko statistisko testu vai modeli, ir sniegti 7. papildinājumā.

61. Tā kā visām vardēm nosaka genotipisko dzimumu, mazuļu paraugojuma dati (piem., pieaugums, HSI) analizējami par katra genotipiskā dzimuma dzīvniekiem atsevišķi.

Ar datu analīzi saistītie apsvērumi

Kompromitētu replikātu un apstrāžu izmantošana

62. Replikātus un apstrādes var kompromitēt pārmērīga mirstība acīmredzamas toksicitātes, slimības vai tehniskas kļūdas dēļ. Ja apstrāde ir kompromitēta slimības vai tehniskas kļūdas dēļ, analīzei jābūt pieejamām trim nekompromitētām apstrādēm ar trim nekompromitētiem replikātiem. Ja acīmredzama toksicitāte konstatējama augsto līmeņu apstrādēs, ir vēlams, lai analīzei būtu pieejami vismaz trīs apstrādes līmeņi ar trim nekompromitētiem replikātiem (atbilstoši maksimālās pieļaujamās koncentrācijas pieejai, ko izmanto ESAO testēšanas vadlīnijās (34)). Līdzās nāves gadījumiem acīmredzamas toksicitātes pazīmes ietver uzvedības īpatnības (piem., pacelšanās ūdens virspusē, gulēšana tvertnes dibenā, peldēšana ar vēderu uz augšu vai haotiska peldēšana, neuzniršana), morfoloģiskus bojājumus (piem., hemorāģiski bojājumi, vēdera uzpūšanās) vai normālas barošanās inhibēšanos kvalitatīvā salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem.

Šķīdinātāja kontrole

63. Testu beidzot, izvērtē potenciālo šķīdinātāja ietekmi (ja tāds izmantots). To dara, šķīdinātāja kontrolgrupu statistiski salīdzinot ar atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu. Visrelevantākie šajā analīzē izskatāmie beigupunkti ir pieauguma determinanti (masa un garums), jo tos var ietekmēt vispārēja toksicitāte. Ja šajos beigupunktos konstatē statistiski nozīmīgas atšķirības starp atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupu un šķīdinātāja kontrolgrupu, tas, vai ir kompromitēts testa derīgums, rūpīgi jāizvērtē speciālistam. Ja abu kontroļu rezultāti ir atšķirīgi, ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzina ar šķīdinātāja kontroli, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama atšķaidīšanas ūdens kontrolei. Ja statistiski nozīmīgu atšķirību starp abām kontrolgrupām nav, ir ieteicams testējamajai ķimikālijai eksponētās apstrādes grupas salīdzināt ar abām grupām (šķīdinātāja un atšķaidīšanas ūdens kontrolgrupām) kopā, ja vien nav zināms, ka priekšroka dodama tikai šķīdinātāja vai tikai atšķaidījuma ūdens kontrolgrupai.

▼M8

Testēšanas pārskats

64. Testēšanas pārskatā norāda šādas ziņas.

Testējamā ķimikālija:

— fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālķīmiskās īpašības;

— vienkomponenta viela:

izskats, šķīdība ūdenī un citas relevantas fizikālķīmiskās īpašības;

ķīmiskā identifikācija, piem., *IUPAC* vai *CAS* nosaukums, *CAS* numurs, *SMILES* vai *InChI* kods, struktūrformula, tīrība, piemaisījumu ķīmiskā identitāte (ciktāl vajadzīgs un iespējams) u. c. (attiecīgā gadījumā arī organiskā oglekļa saturs);

— daudzkomponentu vielas, *UVCB* un maisījumi:

iespējami izsmeļošs raksturojums ar, piem., sastāvdaļu ķīmisko identitāti (sk. iepriekš), tīrību, kvantitatīvo saturu un relevantajām fizikālķīmiskajām īpašībām.

Testa suga:

— zinātniskais nosaukums, celms (ja zināms), avots un apaugļoto ikru ievākšanas metode un turpmākas manipulācijas;

— skoliozes incidence izmantotās izejkultūras vēsturiskajās kontrolēs.

Testa apstākļi:

— fotoperiodi;

— testa plāns (piem., kameru lielums, materiāls un ūdens tilpums, testa kameru un replikātu skaits, testa organismu skaits uz replikātu);

— izejšķīdumu sagatavošanas metode un atjauninašanas biežums (ja tādu izmanto, norāda šķīdināšanas aģentu un tā koncentrāciju);

— testējamās ķimikālijas dozēšanas metode (piem., sūkņi, atšķaidīšanas sistēmas);

— metodei raksturīgā atgūstamība un nominālās testējamās koncentrācijas, kvantitatīvās noteikšanas robeža, mērījumu vidējās vērtības un to standartnovirzes testa traukos un metode, ar ko tās iegūtas, un pierādījumi, ka mērījumi raksturo testējamās ķimikālijas koncentrācijas īstā šķīdumā;

— atšķaidīšanas ūdens raksturlielumi: testa vides pH, cietība, temperatūra, izšķīdušā skābekļa koncentrācija, hlora atlikuma līmeņi (ja mērīti), kopējais jods, kopējais organiskais ogleklis (ja mērīts), suspendētās cietvielas (ja mērītas), sāļums (ja mērīts) un citi izdarītie mērījumi;

— nominālās testējamās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie un to standartnovirzes;

— ūdens kvalitāte testa traukos: pH, temperatūra (katru dienu) un izšķīdušā skābekļa koncentrācija;

▼**M8**

— sīka informācija par barošanu (piem., barības veidi, avots, dotais daudzums un došanas biežums).

Rezultāti:

— pierādījumi, ka kontroles atbilst derīguma kritērijiem;

— šādi dati par kontroli (un šķīdinātāja kontroli, ja tāda ir) un apstrādes grupām: novērotā mirstība un anormālijas, laiks līdz 62. NF stadijai, vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (tikai paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), HSI (tikai paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (tikai paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģiskā novērtējuma rezultāti (tikai paraugotajiem mazuļiem) un VTG plazmā (tikai paraugotajiem mazuļiem un tikai tad, ja šo mērījumu veic);

— statistiskās analīzes pieeja un datu apstrāde (izmantotais statistiskais tests vai modelis);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*);

— katrai novērtētajai atbildreakcijai — zemākā novērojamās ietekmes koncentrācija (*LOEC*) (α=0,05); katrai novērtētajai atbildreakcijai — ECx (attiecīgā gadījumā) un ticamības intervāli (piem., 95 %) un ECx aprēķināšanai pielāgotā modeļa grafiks, koncentrācijas–atbildreakcijas līknes virziena koeficients, regresijas modeļa formula, aplēstie modeļa parametri un to standartkļūdas;

— jebkādas novirzes no testēšanas metodes un novirzes no pieņemamības kritērijiem, kā arī apsvērumi par iespējamo ietekmi uz testa iznākumu.

65. Attiecībā uz beigupunktu mērījumiem jānorāda vidējās vērtības un to standartnovirzes (ja iespējams, gan uz replikātu, gan uz koncentrāciju).

66. Jāaprēķina medianālais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolēs un tas jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi. Šis medianālais laiks jāaprēķina arī apstrādēs un jāattēlo kā replikātu mediānu vidējā vērtība ar standartnovirzi.

LITERATŪRA

(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 (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 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 93: 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 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and 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 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 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) Šā pielikuma C.4. nodaļa. Bionoārdāmības viegluma tests.

(18) Šā pielikuma C.29. nodaļa. Vieglas bionoārdīšanās spēja: CO_2 hermētiski noslēgtos traukos (brīvā tilpuma tests).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) 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), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (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, U.K., 84 pp.

(25) Šā pielikuma C.38. nodaļa. Abinieku metamorfozes tests.

(26) Šā pielikuma C.48. nodaļa. Īsais zivju vairošanās tests.

(27) Šā pielikuma C.41. nodaļa. Zivju dzimumattīstības tests.

(28) Šā pielikuma C.49. nodaļa. Zivju embriju akūtās toksicitātes (*FET*) tests.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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 (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Apikālais beigupunkts: beigupunkts ar ietekmi populācijas līmenī.

Ķimikālija: viela vai maisījums.

ELISA: imūnfermentatīvā analīze.

ECx: (efektīvā koncentrācija, pie kuras ietekme ir x %) ir koncentrācija, pie kuras ietekme uz testa organismiem konkrētā ekspozīcijas periodā salīdzinājumā ar kontroli ir x %. Piemēram, EC_{50} ir koncentrācija, kas pēc aplēsēm konkrētā ekspozīcijas periodā ietekmē kādu testa beigupunktu 50 % no eksponētās populācijas.

dpa: dienas pēc apaugļošanas.

Caurplūdes tests: tests, kurā testa šķīdumi visā ekspozīcijas laikā nepārtraukti plūst caur testa sistēmu.

HHG ass: hipotalāma, hipofīzes un gonādu ass.

IUPAC: Starptautiskā Teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība.

Zemākā novērojamas ietekmes koncentrācija (*LOEC*): ir testējamās ķimikālijas zemākā testētā koncentrācija, pie kuras, salīdzinot ar kontroli, ķimikālijai ir novērota statistiski nozīmīga ietekme ($p < 0,05$). Pie visām testa koncentrācijām, kas augstākas par *LOEC*, ir jābūt kaitīgai ietekmei, kura vienāda ar vai lielāka par ietekmi, kas novērota pie *LOEC*. Ja šos divus nosacījumus nevar izpildīt, jāsniedz pilns paskaidrojums par to, kā *LOEC* (un līdz ar to arī *NOEC*) izraudzīta. Norādījumi sniegti 7. papildinājumā.

Medianālā letālā koncentrācija (LC_{50}): testējamās ķimikālijas koncentrācija, kas pēc aplēsēm testa laikā ir letāla 50 % testa organismu.

Nenovērojamās ietekmes koncentrācija (*NOEC*): testa koncentrācija, kura ir tieši zem *LOEC* un kurai, salīdzinot ar kontroli, noteiktā ekspozīcijas periodā nav nekādas statistiski nozīmīgas ietekmes ($p < 0,05$).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Testējamā ķimikālija: jebkura viela vai maisījums, ko testē ar šo testēšanas metodi.

UVCB: vielas, kuru sastāvs nav zināms vai ir mainīgs, kompleksi reakcijas produkti vai bioloģiski materiāli.

VTG: vitelogenīns, olas dzeltenuma fosfolipīdu glikoproteīna prekursors, kas parasti veidojas tādu seksuāli aktīvu mātīšu organismā, kuras dēj olas / nērš ikrus.

▼**M8**

2. papildinājums

DAŽI PIEŅEMAMA ATŠĶAIDĪŠANAS ŪDENS ĶĪMISKIE RAKSTURLIELUMI

Viela	Robežkoncentrācija
Daļiņas	5 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	1 µg/l
Atlikušais hlors	10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	50 ng/l
Kopējie hlororganiskie pesticīdi un polihlorbifenili	50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	25 ng/l
Alumīnijs	1 µg/l
Arsēns	1 µg/l
Hroms	1 µg/l
Kobalts	1 µg/l
Varš	1 µg/l
Dzelzs	1 µg/l
Svins	1 µg/l
Niķelis	1 µg/l
Cinks	1 µg/l
Kadmijs	100 ng/l
Dzīvsudrabs	100 ng/l
Sudrabs	100 ng/l

▼**M8**

3. papildinājums

TESTA LAGDA NOSACĪJUMI

1. Testa suga	*Xenopus laevis*
2. Testa veids	Pastāvīgas caurplūdes
3. Ūdens temperatūra	Nominālā temperatūra ir 21 °C. Vidējā temperatūra testa laikā ir 21 ± 1 °C (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 1,0 °C)
4. Apgaismojuma kvalitāte	Fluorescējošās spuldzes (plaša spektra), 600–2000 lx (lm/m^2) uz ūdens virsmas
5. Fotoperiods	12 h gaismas, 12 h tumsas
6. Testa šķīduma tilpumdaudzums un testa trauks (tvertne)	4–10 l (ūdens dziļums: vismaz 10–15 cm) Stikla vai nerūsošā tērauda tvertne
7. Testa šķīdumu tilpumapmaiņa	Nemainīga, lai uzturētu gan bioloģiskos apstākļus, gan ekspozīciju ķimikālijai (piem., 5 tvertnes tilpumapmaiņas dienā)
8. Testa organismu vecums iniciēšanas laikā	8.–10. Nivkopa un Fabera (NF) stadija
9. Organismu skaits uz replikātu	20 dzīvnieki (embriji) uz tvertni (replikātu), kad ekspozīcija tiek sākta, un 10 dzīvnieki (mazuļi) uz tvertni (replikātu) no 66. NF stadijas līdz ekspozīcijas beigām
10. Apstrāžu skaits	Vismaz 4 apstrādes ar testējamo ķimikāliju un attiecīga kontrole vai kontroles
11. Replikātu skaits uz vienu apstrādi	4 replikāti uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 8 replikāti kontrolei vai kontrolēm
12. Organismu skaits uz testējamo koncentrāciju	Vismaz 80 dzīvnieki uz apstrādi ar testējamo ķimikāliju un 160 dzīvnieki kontrolei vai kontrolēm
13. Atšķaidīšanas ūdens	Jebkāds ūdens, kurā *X. laevis* var normāli augt un attīstīties (piem., avota ūdens vai caur ogli izfiltrēts krāna ūdens)
14. Aerācija	Nav obligāta, bet tvertnes var būt jāaerē, ja izšķīdušā skābekļa līmenis nokrītas zem ieteicamās robežvērtības un tiek maksimalizēts testa šķīduma caurplūdums.
15. Testa šķīdumā izšķīdušais skābeklis	Izšķīdušais skābeklis: ≥ 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības vai ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16. Testa šķīduma pH	6,5–8,5 (atšķirībām starp replikātiem un apstrādēm nevajadzētu pārsniegt 0,5)
17. Testa šķīduma cietība un sārmainība	10–250 mg $CaCO_3$/l
18. Barošanas režīms	(Sk. 4. papildinājumu)
19. Ekspozīcijas periods	No 8.–10. NF stadijas līdz laikam, kad aprit desmit nedēļas pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai ūdens un/vai šķīdinātāja kontrolgrupā (ne vairāk kā 17 nedēļas)
20. Bioloģiskie beigupunkti	Mirstība (un novērotās anormālijas), laiks līdz 62. NF stadijai (paraugotie kāpuri), vairogdziedzera histoloģiskais novērtējums (paraugotajiem kāpuriem), pieaugums (masa un garums), hepatosomatiskais indekss (paraugotajiem mazuļiem), ģenētisko/fenotipisko dzimumu attiecības (paraugotajiem mazuļiem), gonādu, reproduktīvo kanālu, nieru un aknu histopatoloģija (paraugotajiem mazuļiem) un vitelogenīna līmenis plazmā (paraugotajiem mazuļiem, pēc izvēles)
21. Testa derīguma kritēriji	Izšķīdušais skābeklis > 40 % no gaisa piesātinājuma vērtības; ūdens temperatūra 21 ± 1 °C diapazonā un atšķirības starp replikātiem un apstrādēm < 1,0 °C; testa šķīduma pH no 6,5 līdz 8,5; mirstība kontrolē ≤ 20 % katrā replikātā, un vidējais laiks līdz 62. NF stadijai kontrolē ≤ 45 dienas; kontrolēs un testa kontrolēs (ja tādas izmanto) testa organismu vidējā masa 62. NF stadijā un testa beigās attiecīgi 1,0 ± 0,2 un 11,5 ± 3 g; pieejamas liecības, ka testējamās ķimikālijas koncentrācija šķīdumā ir apmierinoši uzturēta ± 20 % diapazonā ap vidējām izmērītajām vērtībām.

▼M8

4. papildinājums

BAROŠANAS REŽĪMS

Jāatzīmē, ka, lai gan ieteicams izmantot šo barošanas režīmu, ir pieļaujami izmantot arī citus, ja vien testa organismi aug un attīstās pienācīgi raiti.

Kāpuru barošana

Kāpuru barības sagatavošana

A. 1:1 (tilp./tilp.) foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents);

1. foreļu starterbarība: 50 g foreļu starterbarības (smalkas granulas vai pulveris) sajauc ar 300 ml piemērota filtrēta ūdens, to 20 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā;

2. aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījums: 12 g spirulīnas aļģu disku sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens, tos 40 s jaucot blenderī augstas intensitātes režīmā, 12 g *TetraFin*® (vai ekvivalenta) sajauc ar 500 ml filtrēta ūdens un tad abus sajauc kopā, lai iegūtu 1 l 12 g/l spirulīnas aļģu un 12 g/l *TetraFin*® (vai ekvivalenta);

3. sajaukto foreļu starterbarību un aļģu/*TetraFin*® (vai ekvivalenta) maisījumu sajauc vienādos tilpumdaudzumos

B. Sāļūdens garneles:

15 ml sāļūdens garneļu ikru izšķildina 1 l sālsūdens (ko sagatavo, 1 l dejonizēta ūdens pievienojot 20 ml NaCl). Tos 24 h aerē istabas temperatūrā pastāvīgā gaismā un tad ievāc sāļūdens garneles. Aerēšanu izbeidz un sāļūdens garnelēm 30 min ļauj nosēsties. Cistas, kas paceļas trauka augšā, izlej un izmet, bet garneles pienācīgi izfiltrē un tilpumu ar filtrētu ūdeni palielina līdz 30 ml.

Barošanas protokols

1. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod, veicot ekspozīciju, kamēr dzīvnieki ir kāpura stadijās. Dzīvniekus baro trīs reizes dienā no pirmdienas līdz piektdienai un reizi dienā nedēļas nogalēs.

1. tabula.

***X. laevis* kāpuru barošanas režīms caurplūdes apstākļos**

Laiks (*) (pēc apaugļošanas)	Foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents)		Sāļūdens garneles	
	Darbdiena (3 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)	Darbdiena (2 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)
4.–14. diena (0.–1. nedēļa)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (8.–15. dienā) 1 ml (no 16. dienas)	0,5 ml (8.–15. dienā) 1 ml (no 16. dienas)
2. nedēļa	0,67 ml	2,4 ml		
3. nedēļa	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
4. nedēļa	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
5. nedēļa	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Laiks (*) (pēc apaugļošanas)	Foreļu starterbarība: aļģes/*TetraFin*® (vai ekvivalents)		Sāļūdens garneles	
	Darbdiena (3 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)	Darbdiena (2 reizes dienā)	Nedēļas nogale (1 reizi dienā)
6. nedēļa	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
7. nedēļa	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
(8.–10. nedēļa)	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) 0. diena ir tā, kurā injicē *hCG*.

Pāreja no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Kāpuru metamorfozei noslēdzoties, to diētu maina uz mazuļu diētu, kā aprakstīts tālāk. Šīs pārejas laikā būtu jāsamazina kāpuru barības daudzums, vienlaikus palielinot mazuļu barības daudzumu. To var panākt, kāpuru barības daudzumu proporcionāli samazinot un tajā pašā laikā proporcionāli palielinot mazuļu barības daudzumu, katrai piecu kurkuļu grupai pārsniedzot 62. NF stadiju un tuvojoties metamorfozes beigām — 66 NF stadijai.

Mazuļu barošana

Mazuļu diēta

Kad metamorfoze ir beigusies (66. stadija), barošanā pāriet tikai uz 3/32 ″ pirmšķirīgu grimstošu varžu barību (*Xenopus Express*™, FL, ASV) vai ekvivalentu.

Sasmalcinātu granulu sagatavošana pārejai no kāpuru diētas uz mazuļu diētu

Grimstošās varžu barības granulas nedaudz sasmalcina kafijas dzirnaviņās, blenderī vai piestā tā, lai granulu lielums samazinātos par aptuveni 1/3. Apstrādi turpinot pārāk ilgi, iegūst pulveri, un tas nav vēlami.

Barošanas protokols

2. tabulā norādīts, kāda veida barību un cik daudz dod mazuļiem un pieaugušiem īpatņiem. Dzīvniekus baro reizi dienā. Jāatzīmē, ka, dzīvniekiem metamorfozējoties, tie joprojām saņem daļu sāļūdens garneļu, kamēr metamorfoze nav noslēgusies > 95 % dzīvnieku.

Dzīvniekus nevajadzētu barot testa beigu dienā, lai barība neietekmētu masas mērījumus.

2. tabula

***X. laevis* mazuļu barošanas režīms caurplūdes apstākļos. Jāatzīmē, ka nemetamorfozējušies dzīvnieki, arī tādi, kuru metamorfoze aizkavējusies sakarā ar apstrādi ar ķimikāliju, nesasmalcinātas granulas ēst nevar.**

Laiks (*) (Nedēļas pēc medianālās metamorfozes dienas)	Sasmalcinātās granulas (mg uz vardulēnu)	Veselās granulas (mg uz vardulēnu)
Beidzoties dzīvnieku metamorfozei	25	0
0.–1. nedēļa	25	28

▼**M8**

Laiks (*) (Nedēļas pēc medianālās metamorfozes dienas)	Sasmalcinātās granulas (mg uz vardulēnu)	Veselās granulas (mg uz vardulēnu)
2.–3. nedēļa	0	110
4.–5. nedēļa	0	165
6.–9. nedēļa	0	220

(*) 0. nedēļas pirmā diena ir kontroles dzīvnieku medianālā metamorfozes diena.

▼M8

5. papildinājums

ĢENĒTISKĀ DZIMUMA NOTEIKŠANA

Xenopus laevis ģenētiskā dzimuma noteikšanas pamatā ir *Yoshimoto et al.*, 2008. Detalizētas genotipēšanas procedūras vajadzības gadījumā var atrast minētajā publikācijā. Var izmantot arī citas metodes (piem., augsta caurlaiduma kvantitatīvo *PCR*), ja tās uzskata par piemērotām.

***X. laevis* praimeri**

Marķieris DM-W

Tiešais:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Atgriezeniskais:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Pozitīvā kontrole

Tiešais:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Atgriezeniskais:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNS attīrīšana

Attīriet DNS no muskuļu vai ādas audiem ar, piem., *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506)* vai līdzīgu produktu, ievērojot attiecīgā piederumu komplekta instrukcijas. DNS var eluēt no rotācijas stobriņiem, izmantojot mazāk buferšķīduma, lai paraugi būtu koncentrētāki, ja tas šķiet nepieciešams *PCR*. Jāatzīmē, ka DNS ir diezgan stabila, tāpēc jāizvairās no krusteniskās kontaminācijas, kuras iespaidā tēviņus varētu identificēt kā mātītes vai otrādi.

PCR

Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart*^{TM} *Taq* ir sniegts **1. tabulā**.

1. tabula.

Paraugprotokols ar *Sigma JumpStart*^{TM} *Taq*

Pamatmaisījums [*master mix*]	1x (µl)	[Final]
NFW (*)	11	—
10x buferis	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTF (10 mM katrs)	0,4	200 µM
Praimera marķieris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marķieris, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM
Praimera kontrole (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontrole, atgriezeniskais praimeris (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart^{TM} *Taq*	0,4	0,05 vienības/µl
DNS veidne	1,0	~200 pg/µl

(*) Beznukleāzu ūdens.
Piezīme. Gatavojot pamatmaisījumus, sagatavojiet lielāku daudzumu, lai kompensētu pipetēšanā radušos zudumus (piemērs: 25x būtu izmantojams tikai 24 reakcijām).

▼**M8**

Reakcija

Pamatmaisījums	19,0 µl
Veidne	1,0 µl
Kopā	20,0 µl

Termociklera profils:

1. etaps.	94 °C	1 min
2. etaps.	94 °C	30 s
3. etaps.	60 °C	30 s
4. etaps.	72 °C	1 min
5. etaps.	Atgriezties uz 2. etapu.	35 cikli
6. etaps.	72 °C	1 min
7. etaps.	Turēt 4 °C	

PCR produktus var nekavējoties ievietot gēlā vai glabāt 4 °C.

Agarozes gēla elektroforēze (3 %) (paraugprotokols)

50X TAE

Tris	24,2 g
Ledus etiķskābe	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Pievieno ūdeni, līdz tilpums sasniedz 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 agaroze

3 daļas *NuSieve™ GTG™* agarozes

1 daļa Fišera agarozes (ar zemu elektroendoosmozi (EEO))

Metode

1. Sagatavo 3 % gēlu, 1,2 g agarozes maisījuma pievienojot 43 ml 1X TAE. Saskalina, lai sadalītu lielus sakopojumus.

2. Agarozes maisījumu karsē mikroviļņu krāsnī līdz pilnīgai izšķīšanai (neļaujot iet pāri). Ļauj mazliet atdzist.

3. Pievieno 1,0 µl etīdija bromīda (10 mg/ml). Kolbu saskalina. Jāatzīmē, ka etīdija bromīds ir mutagēnisks, tāpēc, ciktāl tas tehniski iespējams, šim solim vajadzētu izmantot citas ķimikālijas, lai mazinātu riskus darba ņēmēju veselībai ([1]).

4. Gēlu ielej veidnē ar ķemmīti. To pilnīgi atdzesē.

([1]) Saskaņā ar 4. panta 1. punktu Eiropas Parlamenta un Padomes 2004. gada 29. aprīļa Direktīvā 2004/37/EK par darba ņēmēju aizsardzību pret risku, kas saistīts ar kancerogēnu vai mutagēnu iedarbību darbā (Sestā atsevišķā direktīva Padomes Direktīvas 89/391/EEK 16. panta 1. punkta nozīmē) (OV L 158, 30.4.2004., 50. lpp.).

▼**M8**

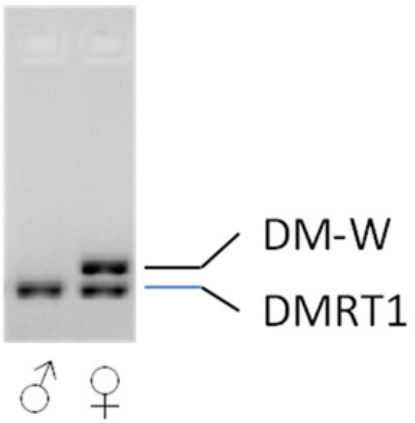
5. Gēlu ievieto aparātā. Gēlu pārklāj ar 1X TAE.

6. Katriem 10 µl *PCR* produkta pievieno 1 µl 6x uznešanas krāsas.

7. Paraugus ar pipeti ievieto iedobēs.

8. Veic elektroforēzi (konstanti 160 volti) ~20 min.

Agarozes gēla attēlu, kurā redzami tēviņiem un mātītēm raksturīgie raksti, sk. **1. attēlā**.



1. attēls. Agarozes gēla attēls, kurā redzami tēviņam (♂) (viena josla, ~203 bp: DMRT1) un mātītei (♀) (divas joslas, ~259 bp: DM-W un 203 bp:DMRT1) raksturīgie raksti.

LITERATŪRA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, 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 105: 2 469-2 474.

▼M8

6. papildinājums

VITELOGENĪNA MĒRĪŠANA

Vitelogenīnu (VTG) mēra, izmantojot imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*), kas sākotnēji izstrādāta melngalvas mailītes VTG mērīšanai (*Parks et al.*, 1999). Pašlaik *X. laevis* nav pieejamas nekādas komerciāli pieejamas antivielas. Tomēr, ņemot vērā, cik daudz ir informācijas par šo proteīnu un cik viegli pieejami ir izmaksefektīvi komerciāli antivielu ieguves pakalpojumi, ir pamats domāt, ka laboratorijas varētu viegli izstrādāt *ELISA* šim mērījumam (*Olmstead et al.*, 2009). *Olmstead et al.* (2009) turklāt aprakstīts testa variants, kas pielāgots VTG mērīšanai *X. tropicalis* (sk. tālāk). Šajā metodē tiek izmantota antiviela pret *X. tropicalis* VTG, bet ir zināms, ka tā darbojas arī ar *X. laevis* VTG. Jāatzīmē, ka var izmantot arī nekonkurējošu *ELISA* un ka tai var būt mazāka noteikšanas robeža nekā tālāk aprakstītajai metodei.

Materiāli un reaģenti

— Iepriekš adsorbētas 1. antivielas (Av) serums

— 1 daļu seruma, kas satur 1. antivielu pret *X. tropicalis* VTG, sajauc ar 2 daļām tēviņu plazmas un atstāj istabas temperatūrā ~75 min, novieto uz ledus uz 30 min, 1 h centrifugē ar > 20 K x G 4 °C temperatūrā, nolej supernatantu, alikvotē un glabā -20 °C.

— 2. antiviela

— kazu prettrušu IgG-HRP konjugāts (piem., *Bio-Rad* 172-1019)

— VTG etalons

— attīrīts *X. laevis* VTG 3,3 mg/ml

— TMB (3,3′,5,5′-tetrametilbenzidīns) (piem., KPL 50-76-00 vai *Sigma* T0440)

— normālais kazu serums (*NGS*)(piem., *Chemicon*® S26-100 ml)

— 96 iedobju EIA polistirola mikrotitrēšanas plates (piem., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— 37 °C hibridizācijas krāsns (vai ātras ekvilibrācijas gaisinkubators) platēm, ūdens vanna stobriņiem

— Cits parasts laboratorijas aprīkojums, ķimikālijas un piederumi.

Receptes

Klājbuferis (50 mM karbonātbuferis, pH 9,6)

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
ūdens	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfāta, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
ūdens	810 ml

▼**M8**

Skalošanas buferis (PBST):

10X PBS	100 ml
ūdens	900 ml

Koriģēt pH līdz 7,3 ar 1 M HCl, tad pievienot 0,5 ml *Tween-20*

Testa buferis:

normālais kazu serums (*NGS*)	3,75 ml
Skalošanas buferis	146,25 ml

Paraugu ņemšana

Ar heparinizētu mikrohematokrītu caurulīti paņem asinis un liek uz ledus. Pēc 3 min ilgas centrifugēšanas caurulīti atzīmē, atlauž un plazmu izspiež 0,6 ml mikrocentrifūgas stobriņos, kas satur 0,13 vienības liofilizēta aprotinīna. (Šos stobriņus sagatavo iepriekš, tajos ievietojot pienācīgu aprotinīna daudzumu, tos sasaldējot un nelielā karstumā liofilizējot vakuumkoncentratorā, līdz tie ir sausi.) Līdz analizēšanai plazmu glabā -80 °C.

Procedūra vienai platei

Plates pārklāšana

20 µl attīrīta VTG sajauc ar 22 ml karbonātbufera (galīgā koncentrācija: 3 µg/ml). Uz katru 96 iedobju plates iedobi pārnes 200 µl maisījuma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h (vai 4 °C uz nakti).

Plates bloķēšana

2 ml normālā kazu seruma (*NGS*) pievienojot 38 ml karbonātbufera, sagatavo bloķējošo šķīdumu. Noņem pārklājšķīdumu un plati nokrata sausu. Uz katru iedobi pārnes 350 µl bloķējošā šķīduma. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 2 h (vai 4 °C uz nakti).

Etalonu sagatavošana

5,8 µl attīrīta VTG etalona vienreizlietojamā 12 x 75 mm borsilikāta stikla mēģenē sajauc ar 1,5 ml testa buferšķīduma. Tā iegūst 12 760 ng/ml. Tad veic sērijveida atšķaidīšanu, 750 µl testa buferšķīduma pievienojot 750 µl iepriekšējā atšķaidījuma, lai iegūtu šādas galīgās koncentrācijas: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 un 50 ng/ml.

Paraugu sagatavošana

Sāk ar plazmas šķīdumu testa buferšķīdumā attiecībā 1:300 (piem., 1 µl plazmas sajauc ar 299 µ testa buferšķīduma) vai 1:30. Ja paredzams liels daudzums VTG, var būt vajadzīga papildu atšķaidīšana vai atšķaidīšana lielākā daudzumā. Jācenšas B/B_o noturēt etalondiapazonā. Ja paraugā VTG nav manāms, piem., kontroles tēviņu un mātīšu (kas visi ir nenobrieduši) gadījumā, izmanto šķīdumu 1:30. Mazāk atšķaidīti paraugi var uzrādīt nevēlamu matricas ietekmi.

Ir ieteicams katrā platē veikt analīzi pozitīvam kontrolparaugam. To ņem no plazmas sakopojuma, kurā ir inducēts augsts VTG līmenis. Šo sakopojumu sākotnēji izšķīdina *NGS*, sadala alikvotās un glabā -80 °C. Katrai platei atkausē vienu alikvotu, to tālāk izšķīdina testa buferšķīdumā un analizē tāpat kā testējamo paraugu.

▼**M8**

Inkubēšana ar 1. antivielu

1. Av sagatavo, iepriekš adsorbētas 1. Av serumu atšķaidot ar testa buferšķīdumu attiecībā 1:2000 (piem., 8 µl uz 16 ml testa buferšķīduma). 300 µl 1. Av šķīduma stikla stobriņā sajauc ar 300 µl parauga/etalona. Līdzīgi sagatavo B_o stobriņu: 300 µl testa buferšķīduma un 300 µl antivielas. Un, izmantojot 600 µl testa buferšķīduma (tikai buferšķīdumu, bez Av), sagatavo NSB stobriņu. Stobriņus pārklāj ar parafilmu un uzmanīgi vorteksē, lai sajauktu. Uz 1 h inkubē 37 °C ūdens vannā.

Plates noskalošana

Tieši pirms 1. Av inkubācijas beigām plati noskalo. To izdara, izkratot saturu un nosusinot ar absorbējošu papīru. Tad iedobes piepilda ar 350 µl skalošanas šķīduma, to izlej un nosusina. Te noder daudzkanālu atkārtojumpipete vai plašu skalotājs. Skalošanas posmu atkārto vēl divas reizes (kopā skalo trīs reizes).

Plates uzpildīšana

Kad plate izskalota, stobriņus izņem no ūdens vannas un viegli vorteksē. Pievieno 200 µl no katra parauga, etalona, B_o un NSB, katru divām plates iedobēm. Plati pārklāj ar adhezīvu noslēdzošu plēvi un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Inkubēšana ar 2. antivielu

Kad beigusies iepriekšējā posmā aprakstītā inkubācija, plati atkal trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Atšķaidīto 2. Av sagatavo, 2,5 µl 2. Av sajaucot ar 50 ml testa buferšķīduma. Uz katru iedobi pārnes 200 µl atšķaidītas 2. Av, noslēdz kā iepriekš un atstāj inkubēties 37 °C 1 h.

Substrāta pievienošana

Kad inkubācija ar 2. Av ir pabeigta, plati trīs reizes izskalo, kā aprakstīts iepriekš. Tad uz katru iedobi pārnes 100 µl TMB substrāta. Reakcijai ļauj turpināties 10 min, vēlams, ne spilgtā gaismā. Reakciju izbeidz, pievienojot 100 µl 1 M fosforskābes. Krāsai jāmainās no zilas uz koši dzeltenu. Ar mikroplašu lasītāju izmēra absorbciju pie 450 nm.

B/B_o aprēķināšana

No visiem mērījumiem atskaita vidējo NSB vērtību. Katra parauga un etalona B/B_o aprēķina, absorbcijas vērtību (B) dalot ar vidējo absorbciju paraugā B_o.

Standartlīknes iegūšana un nezināmo noskaidrošana

Ar grafiku datorprogrammatūru (piem., *Slidewrite*™ vai *Sigma Plot*®) iegūst standartlīkni, kas parauga B/B_o ekstrapolē, balstoties uz etalonu B/B_o. Parasti daudzumu atliek uz logaritmiskas skalas un līkne ir sigmoīda. Tomēr, ja izmanto šauru etalonu diapazonu, tā var izskatīties lineāra. Paraugu daudzumus koriģē pēc atšķaidījuma koeficienta un pārskatā norāda kā mg VTG uz ml plazmas.

Minimālo noteikšanas robežu noteikšana

Bieži vien (it sevišķi normālu tēviņu gadījumā) var nebūt skaidrs, kā norādīt rezultātus, kas iegūti no zemām vērtībām. Šādos gadījumos to, vai vērtība norādāma kā nulle vai cits skaitlis, nosaka ar 95 % ticamības intervālu. Ja parauga rezultāts ir nulles etalona (B_o) ticamības intervāla robežās, rezultāts norādāms kā

▼**M8**

nulle. Minimālais noteikšanas līmenis ir zemākais etalons, kas pastāvīgi atšķiras no nulles etalona; t. i., abi ticamības intervāli nepārklājas. Ja parauga rezultāts ir minimālās noteikšanas līmeņa ticamības intervāla robežās vai to pārsniedz, ziņo aprēķināto vērtību. Ja paraugs ir starp nulles standarta un minimālā noteikšanas līmeņa ticamības intervāliem, kā parauga vērtību ziņo pusi no minimālā noteikšanas līmeņa.

LITERATŪRA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 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 123: 113-125.

▼M8

7. papildinājums

STATISTISKĀ ANALĪZE

Testā *LAGDA* iegūst trīs veidu statistiski analizējamus datus: 1) kvantitatīvi nepārtrauktu beigupunktu dati, 2) "laiks līdz notikumam" tipa dati, kas raksturo attīstības gaitu laika griezumā (laiks līdz 62. NF stadijai) un 3) ordināli dati, kas ir smaguma atzīmes vai ontoģenētiskās stadijas no histopatoloģiskajiem izvērtējumiem. Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testam *LAGDA*, ir sniegta 1. attēlā. Turklāt tālāk sniegtas dažas piezīmes, kas var noderēt, veicot *LAGDA* mērījumu statistisko analīzi. Mirstības, pieauguma (masa un garums) un hepatosomatiskā indeksa (HSI) mērījumu rezultāti diagrammā, pēc kuras pieņem lēmumu par analīzi, būtu jāanalizē pēc diagrammas atzara "Citi beigupunkti".

Nepārtrauktu beigupunktu dati

Vispirms jāpārbauda, vai nepārtrauktu beigupunktu dati ir monotoni, tos hierarhizējot, piemeklējot *ANOVA* modeli un salīdzinot lineāros un kvadrātiskos kontrastus. Ja dati ir monotoni, veic descendentu Džonkhīra–Terpstras trenda testu ar replikātu mediānām un nekādu tālāku analīzi neveic. Normālsadalītiem datiem ar homogēnām dispersijām var izmantot arī descendento Viljamsa testu. Ja dati nav monotoni (kvadrātiskais kontrasts nozīmīgs un lineārais nenozīmīgs), tie jāanalizē, izmantojot jaukto efektu *ANOVA* modeli. Tad jāpārbauda datu normalitāte (vēlams, ar Šapiro–Vilka vai Andersona–Dārlinga testu) un dispersijas homogenitāte (vēlams, ar Levīna testu). Abus testus veic ar jaukto efektu *ANOVA* modeļa atlikumiem. Formālo normalitātes un dispersijas homogenitātes testu vietā var izmantot ekspertu atzinumus, bet priekšroka dodama formālajiem testiem. Ja dati ir normālsadalīti un dispersija ir homogēna, ir izpildīti jaukto efektu *ANOVA* pieņēmumi un nozīmīgu apstrādes ietekmi var noteikt ar Daneta testu. Ja tiek konstatēta nenormalitāte vai dispersijas heterogenitāte, ir pārkāpti Daneta testa pieņēmumi un ir jāveic normalizējoša, dispersiju stabilizējoša transformācija. Ja šādu transformāciju atrast neizdodas, nozīmīgu apstrādes ietekmi nosaka ar Dannas testu. Kad vien iespējams, veic vienpusēju, nevis abpusēju testu, bet tas, kurš tests konkrētam beigupunktam ir piemērots, ir jāizspriež speciālistam.

Mirstība

Dati par mirstību jāanalizē par laiku, kas aptver visu testu, un izsakāmi kā procentuālā daļa dzīvnieku, kas konkrētā tvertnē miruši. Kurkuļi, kuru metamorfoze nenoslēdzas dotajā laikposmā, kurkuļi, kas ir kāpuru apakšparauga kohortā, atlasē atmestie varžu mazuļi un visi dzīvnieki, kas mirst eksperimentatora kļūdas dēļ, ietverami cenzētajos datos, un procentu aprēķina saucējā tos neiekļauj. Pirms jebkādu statistisko analīžu veikšanas mirstības proporcijām jāveic arksinusa–kvadrātsaknes transformācija. Alternatīva ir izmantot descendentu Kohrana–Ārmitidža testu, vēlams, ar Rao–Skota korekciju, ja izkliede ir pārmērīga.

Masa un garums (pieauguma dati)

Tēviņi un mātītes metamorfozes laikā nav dzimumdimorfi, tāpēc kāpuru apakšparaugojuma pieauguma datus analizē neatkarīgi no dzimuma. Savukārt mazuļu pieauguma datus analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma. Šiem beigupunktiem var būt jāveic logaritmiska transformācija, jo dati par lielumu bieži vien ir lognormāli.

▼M8

Hepatosomatiskais indekss (HSI)

Aknu masu normalizē kā visa ķermeņa masas proporciju (t. i., HSI) un analizē atsevišķi pēc ģenētiskā dzimuma.

Laiks līdz 62. NF stadijai

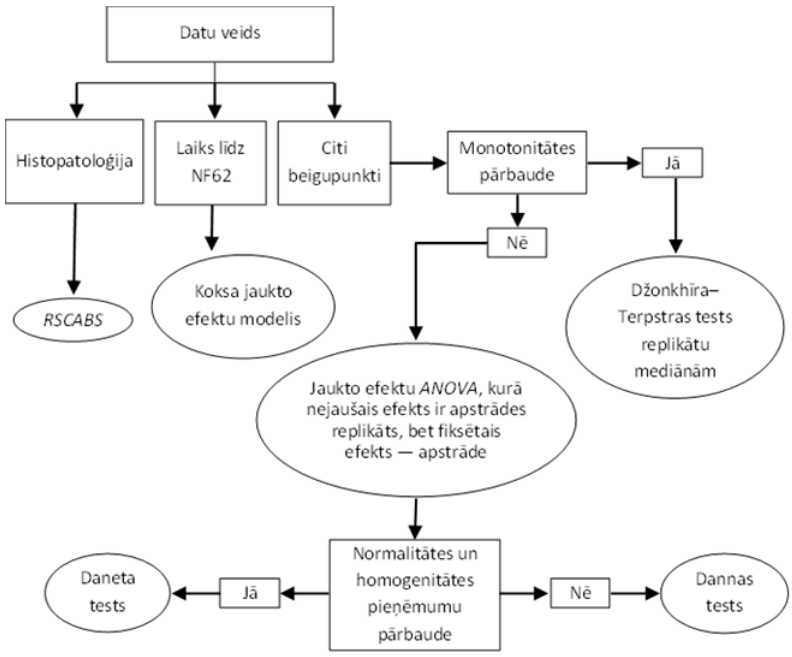
Dati par laiku līdz metamorfozei apstrādājami kā dati par laiku līdz notikumam, un nāves gadījumi vai tas, ka īpatnis nesasniedz 62. NF stadiju 70 dienās, jāuztver kā labēji cenzēti dati (t. i., patiesā vērtība pārsniedz 70 dienas, bet pētījums beidzas, pirms dzīvnieki 70 dienās sasnieguši 62. NF stadiju). Testa beigu dienu nosaka pēc medianālā laika līdz 62. NF stadijai (metamorfozes beigas) atšķaidīšanas ūdens kontrolēs. Medianālo laiku līdz metamorfozes beigām var noteikt ar Kaplana–Meiera reizinājuma robežas novērtētājiem. Šis beigupunkts jāanalizē, izmantojot jaukto efektu Koksa proporcionālo apdraudējumu modeli, kurā ņem vērā pētījuma replikātu struktūru.

Histopatoloģiskie dati (smaguma atzīmes un ontoģenētiskās stadijas)

Histopatoloģiskie dati tiek iegūti smaguma atzīmju vai ontoģenētisko stadiju formā. Testā *RSCABS* (*Rao–Scott Cochran–Armitage by Slices*) katram histopatoloģiskās atbildreakcijas smaguma līmenim tiek izmantots descendents Kohrana–Ārmitidža trenda tests ar Rao–Skota korekciju (*Green et al.*, 2014). Rao–Skota korekcija testā ļauj ņemt vērā eksperimenta plānu ar replikāttraukiem. Procedūra *by Slices* ietver bioloģisko ekspektāciju, ka ietekmes smagums pieaugs, palielinoties devai vai koncentrācijai, vienlaikus saglabājot īpatņu atzīmes un atspoguļojot konstatētās ietekmes smagumu. Procedūra *RSCABS* ne vien nosaka, kuras apstrādes statistiski atšķiras no kontrolēm (t. i., kurām novērojamas smagākas patoloģijas nekā kontrolēm), bet arī nosaka, pie kādas smaguma atzīmes atšķirība konstatējama, tā analīzei dodot vajadzīgo kontekstu. Kas attiecas uz gonādu un reproduktīvo kanālu ontoģenētiskās stadijas noteikšanu, ar datiem jāveic papildu manipulācijas, jo viens no *RSCABS* pieņēmumiem ir: ietekmes smagums pieaug līdz ar devas palielināšanos. Novērotā ietekme var būt attīstības aizkavēšanās vai paātrināšanās. Tāpēc dati par ontoģenētiskajām stadijām būtu jāanalizē tādi, kādi norādīti, lai noteiktu attīstības paātrinājumu, bet tad manuāli jāinvertē pirms otrās analīzes, ar kuru nosaka attīstības palēninājumu.

1. attēls.

Diagramma, pēc kuras pieņemams lēmums par ieteicamo statistisko analīzi testa *LAGDA* datiem.



▼**M8**

LITERATŪRA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

▼M8

8. papildinājums

APSVĒRUMI, KAS SAISTĪTI AR SKOLIOZES GADĪJUMU APSEKOŠANU UN MINIMALIZĒŠANU

Testa populācijās morfoloģiskos un uzvedības novērojumus var apgrūtināt idiopātiska skolioze, kas *Xenopus laevis* kurkuļos parasti izpaužas kā saliekta aste. Jācenšas skoliozes incidenci minimalizēt vai pavisam novērst — gan krājumā, gan testa apstākļos. Galīgajā testā ieteicams panākt, ka vidējas un smagas skoliozes prevalence nesasniedz 10 %, lai palielinātu ticamību, ka ar testu var detektēt ar apstrādi saistītu ontoģenētisko ietekmi uz citādi veseliem abinieku kāpuriem.

Dienišķajos novērojumos galīgā testa laikā jāreģistrē gan skoliozes incidence (īpatņu skaits), gan smagums, ja tā novērojama. Jāraksturo anormālijas vieta (piem., pirms kloākas vai aiz tās) un izliekuma virziens (piem., laterāls vai dorsoventrāls — virzienā no muguras uz vēderu). Skoliozes smagumu var vērtēt ar šādām atzīmēm:

N (neizteikta) — izliekuma nav;

(1) minimāla: viegls laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams tikai miera stāvoklī;

(2) vidēja: laterāls izliekums aiz kloākas, novērojams pastāvīgi, bet kustības netraucē;

(3) smaga: laterāls izliekums pirms kloākas VAI jebkāds izliekums, kas traucē kustēties, VAI jebkāds dorsoventrāls izliekums.

ASV VAA *FIFRA* zinātniskā konsultatīvā paneļgrupa (*FIFRA SAP 2013*) izskatīja datu kopsavilkumu par skoliozi piecpadsmit abinieku metamorfozes testos ar *X. laevis* (no 51. NF stadijas līdz posmam pēc 60. stadijas) un sniedza vispārīgus ieteikumus, kā testa populācijās šīs anormālijas prevalenci mazināt. Lai gan *LAGDA* ontoģenētiskais laika griezums ir plašāks, tie ir relevanti arī šim testam.

Vēsturiskie nārsta rādītāji

Par vaislas pāriem principā jāizmanto kvalitatīvi, veseli pieauguši īpatņi; atsakoties no vaislas pāriem, kuru pēcnācējiem ir skolioze, tās gadījumu skaitu laika gaitā var mazināt. Konkrētāk, var būt lietderīgi minimalizēt savvaļā sagūstītu nārsta baru izmantošanu. Testā *LAGDA* ekspozīcijas periodu sāk ar 8.–10. NF stadiju sasniegušiem embrijiem, un nav iespējams testa sākumā noteikt, vai konkrētiem īpatņiem parādīsies skolioze. Tāpēc līdzās skoliozes incidences apsekošanai testa dzīvniekos būtu jādokumentē vēsturiskie ikru kamolu rādītāji (arī skoliozes prevalence kāpuros, kam ļauj attīstīties). Var būt lietderīgi turpināt monitorēt to katra kamola ikru daļu, ko konkrētā pētījumā neizmanto, un novērojumus iekļaut pārskatā (*FIFRA SAP 2013*).

Ūdens kvalitāte

Ir svarīgi gan laboratorijas krājumā, gan testā nodrošināt pietiekamu ūdens kvalitāti. Līdzās ūdens kvalitātes kritērijiem, ko tipiski izvērtē ūdenstoksiskuma testos, var būt lietderīgi monitorējot sekot līdzi, vai nav konstatējama barības vielu nepietiekamība (piem., C vitamīna, kalcija, fosfora nepietiekamība) vai selēna vai vara pārdaudzums, un to izlabot; ir ziņas ka šie apstākļi dažādos apmēros izraisa skoliozi laboratorijā audzētos *Rana* sp. un *Xenopus* sp. dzīvniekos (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; pēc *FIFRA SAP 2013* ziņām). Ūdens kvalitāti un testa īpatņu veselību parasti uzlabo piemērots dietārais režīms (sk. 4. papildinājumu) un regulāra tvertnes tīrīšana.

▼**M8**

Diēta

Konkrēti ieteikumi attiecībā uz dietāro režīmu (par kuriem zināms, ka tie labi der testam *LAGDA*) sniegti 4. papildinājumā. Ieteicams barības avotus pārbaudīt uz bioloģiskiem toksīniem, herbicīdiem un citiem pesticīdiem, par kuriem zināms, ka tie *X. laevis* vai citos ūdensdzīvniekos izraisa skoliozi (Schlenk and Jenkins 2013). Piemēram, ar skoliozi zivīs (Schultz *et al.* 1985) un vardēs (Bacchetta *et al.* 2008) ir asociēta eksponētība dažiem holīnesterāzes inhibitoriem.

LITERATŪRA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 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 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.